

Aus dem Institut für Physiologische Chemie der
Philipps-Universität in Marburg

Direktor: Prof. Dr. Dr. P. Karlson

Verteilungsmuster
eukaryonter RNA Polymerasen in Zellen
unterschiedlichen Funktionszustandes

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

eingereicht dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

CHRISTIANE KRÜGER

aus Lübeck

Marburg 1977

Druck: Mauersberger, Marburg

Aus dem Institut für Physiologische Chemie der
Philipps-Universität in Marburg

Direktor: Prof. Dr. Dr. P. Karlson

Verteilungsmuster
eukaryonter RNA Polymerasen in Zellen
unterschiedlichen Funktionszustandes

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

eingereicht dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

CHRISTIANE KRÜGER

aus Lübeck

Marburg 1977

Druck: Mauersberger, Marburg



angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Universität Marburg am 15.6.1977

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. F. Neurath

Referent: Prof. Dr. Dr. P. Karlson

Correferent: Prof. Dr. Dr. K.H. Seifart

Die vorliegende Arbeit wurde am
Institut für Physiologische Chemie
der Philipps-Universität in Marburg
unter der Leitung von
Herrn Prof. Dr. Dr. K.H. Seifart
angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Dr. K.H. Seifart möchte
ich für Unterstützung und anregende
Diskussionen danken.

Ebenfalls danke ich dem Direktor des
Instituts für Physiologische Chemie,
Herrn Prof. Dr. Dr. P.Karlson, für
die Förderung der Arbeit.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552327_0066

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
2. <u>Material und Methoden</u>	8
2.1. Material	8
2.2. Methoden	10
2.2.1. Gewinnung des Untersuchungsmaterials	10
2.2.2. Einbau radioaktiver Vorstufen in Zellfraktionen	15
2.2.3. Bestimmung der Aktivität der RNA Polymerase	15
2.2.4. Säulenchromatographie	17
3. <u>Ergebnisse</u>	19
3.1. Einfluß von Teilhepatektomie auf die RNA Synthese in vivo	19
3.2. Einfluß von Teilhepatektomie auf die RNA Synthese in vitro und auf die Aktivität isolierter RNA Po- lymerasen im Restlebergewebe	19
3.2.1. RNA Synthese in isolierten Kernen 12 Stunden nach Teilhepatektomie	19
3.2.2. Einfluß unterschiedlicher Regenerationszeiten auf die RNA Synthese in isolierten Kernen	24
3.2.3. Isolierung von Polymerase A, B und C aus Leber- zellen hepatektomierter Ratten und von Kontrollen	27
3.2.3.1. Einfluß der Regenerationszeit	27
3.2.3.2. RNA Polymerasen A, B und C 12 Stunden nach Teilhepatektomie	30
3.2.3.3. Einfluß von Cycloheximid auf die Enzymaktivität nach Teilhepatektomie	39

	Seite
3.2. RNA-Synthese und Aktivität isolierter Poly- merasen in Entenerythrozyten unterschiedlichen Differenzierungsgrades	44
3.2.1. RNA Synthese in isolierten Erythrozytenkernen	44
3.2.2. Isolierung von Polymerasen aus Erythrozyten normaler und anämischer Enten	46
3.2.2.1. RNA Polymerasen aus ganzen Zellen	46
3.2.2.2. RNA Polymerasen aus isolierten Kernen	49
4. <u>Diskussion</u>	51
5. <u>Zusammenfassung</u>	66
6. <u>Literaturverzeichnis</u>	69

Einleitung

Lebende Organismen sind Systeme, in denen die Information zur Reproduktion bewahrt und weitergegeben wird. Die Informationsweitergabe von der DNA bis zum Protein unterliegt komplizierten Regelungsvorgängen. Obwohl alle Zellen eines Organismus dieselbe genetische Information besitzen, wird sie im Laufe der Entwicklung in den einzelnen Zellen unterschiedlich realisiert. Spezifische Funktions- und Strukturzustände einer Zelle sind Produkte dieser qualitativ und quantitativ differentiellen Genexpression. Beim Transkriptionsvorgang kommt es zur Ausbildung komplementärer Basensequenzen (RNA) an der DNA-Matrize. Diese RNA Synthese wird durch ein Enzym, die DNA abhängige RNA Polymerase (EC 2.7.7.6.), katalysiert. An den Ribosomen erfolgt die Translation der mRNA in Proteine. Die dreidimensionale Struktur des synthetisierten Proteins ist gleichfalls in der linearen Nukleotidsequenz der DNA festgelegt. Die Regelungsvorgänge der Genexpression in Prokaryonten sind schon weitgehend bekannt. Ein Modell, das auf der Annahme einer negativen Regulation der Transkription durch spezifische Repressoren (Proteinmoleküle) beruht, haben Jacob und Monod (1961) entwickelt. Die Synthese kataboler Enzyme wird danach folgendermaßen kontrolliert: Regulatorgene kodieren für Repressoren, die spezifisch durch Wechselwirkung mit dem Operator die RNA Polymerase hindern, bestimmte Strukturgene zu transkribieren.

Durch Kombination des Repressors (allosterisches Protein) mit einem Induktor (Stoffwechselprodukt) wird die Affinität des Repressors zum Operator verringert. Nach Abspaltung des Repressors werden die Strukturgene von der RNA Polymerase abgelesen und die katabolen Enzyme synthetisiert. Neben der Abwesenheit eines Repressors ist die spezifische Bindung der Polymerase an den Promotor Voraussetzung für die Transkription. Es ist inzwischen gelungen, Teile des Prokaryontengenoms (Promotoren, repressorbindende Genabschnitte) und Repressoren zu sequenzieren.

In Eukaryonten sind die strukturelle Organisation des genetischen Materials und die Vorgänge bei Transkription und Translation komplexer. In Eukaryonten führt eine Bindung von bestimmten Proteinen an die DNA zur Ausbildung von Chromatin. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Assoziation zwischen DNA und Histonen zu regelmäßig aufgebauten Struktureinheiten, den Nukleosomen, führt (Olins und Olins, 1974). Es ist allerdings noch nicht bekannt, welche Rolle die Nukleosomen während des Transkriptionsvorgangs spielen.

Im Gegensatz zu Prokaryonten, bei denen die Synthese aller RNA-Spezies durch ein Enzym katalysiert wird, kommt die RNA Polymerase in höheren Organismen in multiplen Formen vor (Roeder und Rutter, 1969), die sich in ihren katalytischen und chromatographischen Eigenschaften und in ihrer subzellulären Lokalisation unterscheiden.

Das A-Enzym, das im Nukleolus lokalisiert ist und für die Synthese der Vorläufer der ribosomalen RNA verantwortlich ist (Udvardy und Seifart, 1976; Holland et al., 1977), ist resistent gegenüber α -Amanitin, einem Gift des grünen Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides*.

Das im Nukleoplasma befindliche B-Enzym wird schon durch geringe Konzentrationen von α -Amanitin (0.1 $\mu\text{g/ml}$) vollständig gehemmt. Dem B-Enzym wird die Synthese hochmolekularer RNA (hnRNA), der Vorstufe der mRNA, zugeordnet, obwohl eine Produktanalyse bis jetzt nicht vorliegt.

Die Synthese niedermolekularer RNA-Spezies (5sRNA, pre-tRNA) wird durch das C-Enzym katalysiert (Mc Reynolds und Penman, 1974; Weinman und Roeder, 1974; Udvardy und Seifart, 1976). Das C-Enzym, das zunächst im Cytoplasma nachgewiesen wurde (Seifart und Benecke, 1972; Amalric et al., 1972) und das nach neueren Erkenntnissen auch im Kern vorkommen kann (Roeder, 1974; Seifart und Benecke, 1975; Hossenlopp et al., 1975), läßt sich aufgrund seines Verhaltens gegenüber α -Amanitin (erst hemmbar bei einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$) vom A- und B-Enzym abgrenzen. Da die einzelnen Polymerasen in vivo ganz bestimmte Genabschnitte transkribieren, kommt ihnen eine wichtige Funktion bei der selektiven Transkription zu. Das Vorhandensein von drei verschiedenen Transkriptionssystemen vereinfacht also die Regulation der Genexpression in Eukaryonten.

Ein weiteres Charakteristikum des Transkriptionsvorgangs

bei Eukaryonten ist die Umwandlung des primären Transkriptionsproduktes hnRNA in mRNA (Prozessierung). Die mRNA enthält nur einen Teil der Sequenzen der hnRNA (Herman et al., 1976). Außerdem findet bei diesem Vorgang eine Addition eines Poly(A)-Segments an das 3'-OH-Ende (Edmonds und Caramela, 1969) und einer CAP-Struktur an das 5'-Ende der RNA (Rottman et al., 1974) statt.

Die Evolution eines Zellkerns in Eukaryonten hat zur Folge, daß die Transkription im Zellkern und die Translation der mRNA im Cytoplasma örtlich voneinander getrennt sind. Für die eukaryonte Zelle ergeben sich also mehrere Möglichkeiten, die Realisierung der genetischen Information zu regulieren.

- a) differentielle Transkription durch unterschiedliche Spezifität und Effizienz der Polymerasen
- b) selektive Stabilisierung und Modifizierung der hnRNA und mRNA (Kafatos, 1972; Huez et al., 1974); kontrollierter Transport der RNA in das Cytoplasma (posttranskriptionelle Kontrolle)
- c) Translationskontrolle, die eine Veränderung der Effizienz des Translationsapparates (Ribosomen, mRNA, Faktoren) bewirkt
- d) selektive Stabilisierung des Translationsprodukts.

Die folgenden Ausführungen betreffen nur die Kontrolle, die zu quantitativen und/oder qualitativen Veränderungen der RNA Synthese führen kann.

Qualitative Veränderungen in der Synthese der RNA-Spezies (rRNA, hnRNA, 5sRNA und pre-tRNA) beobachtet man in den Zellen eines Organismus im Laufe der Entwicklung oder nach Gabe von Hormonen. In differenzierten Zellen tritt nach Einwirkung eines exogenen Stimulus (z.B. partielle Hepatektomie, Phytohaemagglutinin) eine zumeist quantitative Veränderung der RNA Synthese ein.

Um komplexe Reaktionen auf einfache äußere Signale (z.B. Hormone), integrierte Aktivierung zahlreicher verschiedener Gene und auch die Existenz repetitiver DNA-Sequenzen zu erklären, haben Britten und Davidson (1969) folgendes Modell vorgeschlagen: Bestimmte Genabschnitte (Sensorgene) binden Hormone oder andere Agentien, und das führt zu einer Aktivierung von Integratorgenen, die dann transkribiert werden und Aktivator-RNA liefern. Die Aktivator-RNA bildet einen sequenzspezifischen Komplex mit dem Regulatorgen, und es kommt zur Transkription eines dem Strukturgen bei Bakterien analogen Genabschnitts. Da einerseits die Aktivierung eines Sensorgens zur Transkription mehrerer Strukturgene führen kann, andererseits mehrere induzierte Sensorgene dasselbe Strukturgen aktivieren können, ergibt sich eine große Variabilität. Dieses Modell erlaubt zwar die Erklärung einiger Phänomene der Genexpression in Eukaryonten; seine Gültigkeit muß jedoch in der Zukunft noch nachgewiesen werden.

Quantitative oder qualitative Kontrolle der RNA Synthese kann folgendermaßen geschehen:

- a) Modifizierung der Matrizen kann Initiations- und Elongationsaktivität von Polymerasemolekülen und damit Selektivität und Geschwindigkeit der Transkription verändern.
- b) Die Konzentration der Polymerasen kann begrenzender Faktor für die RNA Synthese sein.
- c) Modifizierung des Polymerasemoleküls kann die Aktivität und Affinität des Enzyms zu bestimmten Genen verändern.

Bei der Aktivitätsbestimmung isolierter Polymerasen an einer exogenen Matrizen wird die chromosomale Struktur als möglicher kontrollierender Faktor ausgeschlossen, so daß eine Aussage über die Menge der Polymerasen möglich ist. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Aktivität bzw. Menge isolierter Polymerasen in Geweben zu verfolgen, in denen man experimentell eine Veränderung der RNA Synthese erzeugen kann.

- a) In der Rattenleber bewirkt partielle Hepatektomie eine Stimulierung der RNA Synthese in dem restlichen Lebergewebe (Fujioka et al., 1963). Zu den Veränderungen, die nach Hepatektomie in dem restlichen Lebergewebe induziert werden, zählen u.a. eine erhöhte Matrizenaktivität (Pogo et al., 1966; Garrard und Bonner, 1974), eine Zunahme des RNA-Gehalts des Nukleolus (Swift et al., 1956) und eine gesteigerte DNA Synthese 15-18 Stunden postoperativ (Grisham, 1956).

- b) Experimentelle Erzeugung einer hämolytischen Anämie durch Phenylhydrazin in Enten führt dazu, daß im Blut neben reifen Erythrozyten vermehrt unreife Vorstufen vorhanden sind. Während der Differenzierung der unreifen Formen in reife Erythrozyten kommt zu einer Veränderung des RNA Synthesemusters. In reifen Erythrozyten findet im Gegensatz zu unreifen Vorstufen keine Synthese von Hämoglobin mehr statt. Die Differenzierung beinhaltet also eine allmähliche Inaktivierung des Genoms (Attardi et al., 1970). Untersuchungen in diesem System sollten zeigen, ob der Verlust der RNA Syntheseaktivität auch von Änderungen der Polymeraseaktivitäten begleitet wird.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Als Ausgangsmaterial für die Untersuchungen dienten

- a) Lebern von männlichen Wistar BR II Ratten (100-180 g),
die von der Tierzüchterei Brünger in Halle/Westfalen
bezogen wurden,
- b) Blut von männlichen und weiblichen Enten (2-4 kg).

Das Radiochemical Center Amersham lieferte $[^3\text{H}]$ -UTP (14-23 Ci/mMol), $[^3\text{H}]$ -Orotsäure (20 Ci/mMol) und $[^{14}\text{C}]$ -Leucin (348 mCi/mMol).

Es wurden bezogen

poly dAT, Nukleosidtriphosphate, Kreatinphosphat, Kreatinphosphokinase und α -Amanitin von Boehringer (Mannheim); DEAE-Cellulose (DE-32, 1meq/g) von Whatman (London); DEAE-Sephadex A-25 von Pharmacia (Uppsala); Actinomycin D und Cycloheximid (Actidion) von Serva (Heidelberg); DNA (aus Kalbsthymus) von Calbiochem (Los Angeles).

Alle anderen Chemikalien wurden in p.a. Qualität von der Firma Merck (Darmstadt) geliefert.

Puffersysteme:

Puffer I (TSS-Puffer): 0.05 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.25 M
Saccharose, 0.01 M MgCl_2 , 0.025 M
KCl

Puffer II (Polymerase-Puffer): 0.05 M Tris-HCl pH 7.9,
20% Glycerin, 5 mM Mercap-
toäthanol, 0.25 mM EDTA

Puffer III (Extraktionspuffer): 0.075 M Tris-HCl pH 7.9,
20% Glycerin, 1.0 mM MgCl_2 ,
0.25 mM EDTA, 5 mM β -Mer-
captoäthanol, 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Puffer IV (Erythrocytenwaschpuffer): 0.15 M NaCl, 0.03 M
Tris-HCl pH 7.4

2.2. Methoden

2.2.1. Gewinnung des Untersuchungsmaterials

a) aus Ratten

Die partielle Hepatektomie wurde nach der Methode von Higgins und Anderson (1931) durchgeführt. Der mittlere und linke Leberlappen wurde nach ventraler Laparotomie entnommen, nachdem die Blutzufuhr durch Abbinden der Blutgefäße unterbrochen worden war. Die Operation wurde unter Äthernarkose vorgenommen. Die Regenerationszeit betrug ungefähr 12 Stunden, wenn nicht anders angegeben. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Tiere durch cervikale Dislokation getötet. Nach Injektion von 10 ml isotonem TSS-Puffer (eiskalt) in die Pfortader zur Durchspülung der Leber in situ wurde den operierten Tieren der restliche Leberlappen entfernt und von nekrotischem Gewebe befreit. Den Kontrolltieren wurde nur der korrespondierende Leberlappen entnommen. Die Leber wurde mit einer Schere grob zerkleinert und im Glas-Teflon-Homogenisator (etwa 5 g Leber/ 30 ml TSS) homogenisiert. Durch Zentrifugation bei 1000 x g für 7 Minuten erfolgte eine grobe Trennung in Kernsediment und Überstand, die getrennt aufgearbeitet wurden. Der Überstand diente als Ausgangsmaterial für die Gewinnung des partikelfreien Überstandes. Zentrifugation bei 48.000 x g für 30 Minuten bewirkte, daß die Mitochondrien sedimentierten und Lipide als weißliche Schicht flotierten. Nach Entfernung dieser Lipidschicht wurde der Überstand

bei 100.000 x g für 3 Stunden zentrifugiert, um Ribosomen und partikuläres Glykogen abzutrennen. Der partikelfreie Überstand wurde zur Darstellung der cytoplasmatischen Polymerase C verwendet. Er wurde zur Stabilisierung der Polymerase mit Glyzerin (20% Endkonzentration) versetzt und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C aufbewahrt. Aus dem Kernsediment, das neben Zellkernen Membranfragmente und andere Zellbestandteile enthielt, wurden Zellkerne nach der Methode von Chauveau et al. (1956) isoliert. Dazu wurde das Kernsediment in hypertonischer 2.2 M Saccharose (in TSS) suspendiert und auf ein Kissen von 2.2 M Saccharose in TSS überschichtet. Nach 2 Stunden Zentrifugation im Rotor SW27 bei 100.000 x g bildeten die Kerne ein weißliches Sediment, während sich die übrigen Zellbestandteile als rötlichbraune Schicht an der Oberfläche der Saccharoselösung befanden. Die Kerne wurden vorsichtig in 2-5 ml TSS-Puffer homogenisiert, entweder sofort zur RNA-Synthese verwendet oder nach Zugabe von Glyzerin (20% Endkonzentration) bei -80°C eingefroren. Von der Kernsuspension wurden Aliquots für die DNA-Bestimmung (Burton, 1956) entnommen, 1:10 mit TSS verdünnt und bei -20°C aufbewahrt. Die Präparation der Kerne und des partikelfreien Überstands aus Lebern partiell hepatektomierter Tiere (Gruppe TH) und von Kontrolltieren (Gruppe K) erfolgte unter identischen Bedingungen, ebenso wie die in einem folgenden Abschnitt beschriebene Extraktion der Kerne.

Wurde die RNA-Synthese in isolierten Kernen gemessen, dienten pro Gruppe 4-5 g Leber als Ausgangsmaterial. Für die Isolierung von Polymerasen aus Kernen und cytoplasmatischem Überstand wurden 10-15 g Leber verwendet.

Extraktion der Polymerasen aus Kernen

Alle multiplen Formen der RNA Polymerase befinden sich im Zellkern in zwei Zustandsformen, der löslichen oder freien Polymerase und dem in einem Transkriptionskomplex an das Chromatin gebundenen Enzym (Yu, 1974). Die letztere Form ist in Puffern niedriger Ionenstärke nicht löslich. Die Dissoziation dieses Komplexes wurde erreicht, indem die Kernsuspension, nach vorsichtigem Auftauen bei 4°C, mit Extraktionspuffer (1 M Ammoniumsulfat) versetzt und zusätzlich mit Ultraschall (Branson Sonifier, 125 W) behandelt wurde (6 x 5 Sekunden, Pausen von 10 Sekunden). Damit wurde eine Zerstörung der Kernstrukturen und eine Verringerung der Molekülgröße der DNA bewirkt, makroskopisch sichtbar durch eine Viskositätsabnahme der Lösung. Anschließend wurde das unterschiedliche Verhalten gegenüber einer Erhöhung der Ionenstärke ausgenutzt, indem durch Zugabe von kristallinem Ammoniumsulfat (3.3 g/10 ml) die Proteine ausgefällt und durch Zentrifugation (100.000 x g; 90 Minuten; SW 27) von der in Lösung bleibenden Nukleinsäure abgetrennt wurden. Von dem Überstand wurde das UV-spektrum zur Quantitierung der Ausgangsmengen ermittelt. Das Proteinsediment wurde in 10 ml Puffer II resuspendiert.

Nach der sich anschließenden Dialyse gegen 500 ml Puffer II für mindestens 3 Stunden betrug die Leitfähigkeit 4-5 mS (WTV-Meßgerät, Modell LF 39). Die Erniedrigung der Ionenstärke während der Dialyse bewirkte, daß ein Teil der Proteine durch Reassoziaton mit anderen Proteinen wiederausfielen. Durch Zentrifugation bei 500 x g für 4 Minuten wurden die unlöslichen Proteine teilweise sedimentiert. Der Überstand wurde zur Chromatographie verwendet.

b) aus Enten

Zur Erzeugung einer hämolytischen Anämie wurde den Enten Phenylhydrazin (2.5% in Wasser, pH 7.0) intramuskulär injiziert. An vier aufeinander folgenden Tagen erhielten die Tiere 15 mg Phenylhydrazin/kg Körpergewicht. Der zunehmende Blässegrad der Schwimmhäute und des Schnabels diente als Indikator des Anämiegrades. Nach einem Ruhetag (5. Tag) wurde am 6. Tag den anämischen Enten und auch den Kontrolltieren eine Lösung von Nembutal (50 mg/kg Körpergewicht) und Heparin (1000 IE/kg Körpergewicht) in die Flügelvene injiziert. Nach eingetretener Anaesthesie wurden die Tiere durch Freilegung und anschließendem Durchtrennen der Halsvene soweit wie möglich entblutet. Die Blutmenge betrug je nach Größe des Tieres 100-180 ml. Das Blutplasma wurde von den korpuskulären Blutbestandteilen durch Zentrifugation bei 500 x g für 10 Minuten abgetrennt. Die Leukozyten, die einen weißen Saum am oberen Rand des Erythrozytensediments bildeten, wurden

entfernt. Das Sediment wurde zweimal mit Puffer IV gewaschen und nach jedem Zentrifugationsvorgang von restlichen Leukozyten befreit. Die gewaschenen Erythrozyten bildeten das Ausgangsmaterial für die Isolierung von Erythrozytenkernen. Die RNA Polymerasen wurden entweder aus diesen isolierten Zellkernen oder direkt aus ganzen Zellen gewonnen.

Isolierung von Erythrozytenzellkernen

Die Erythrozyten wurden in TSS mit 0.2% Triton-X-100 aufgenommen und im Dounce-Homogenisator (mit engem Pistill) durch ca. 20 Auf- und Abbewegungen homogenisiert. Dieser Vorgang wurde im Phasenkontrastmikroskop kontrolliert und so lange durchgeführt, bis die Mehrzahl (etwa 80%) der Zellen zerstört waren. Nach Zentrifugation des Homogenats bei 1100 x g für 7 Minuten erhielt man ein zweischichtiges Pellet. Die Zellkerne, die den oberen Teil des Pellets bildeten, wurden in TSS-Puffer resuspendiert und rezentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, bis die Kerne nur in ganz geringem Umfange mit ganzen Zellen und Cytoplasma kontaminiert waren. Diese Kerne wurden zur RNA-Synthese oder für die Extraktion der RNA-Polymerasen verwendet.

Aliquots der Kernsuspension wurden für die DNA-Bestimmung eingesetzt.

2.2.2. Einbau radioaktiver Vorstufen in bestimmte Zellfraktionen der Leberzelle

Die in vivo Applikation von radioaktiven Vorstufen ($[^3\text{H}]$ -Orotsäure; $[^{14}\text{C}]$ -Leucin) und Inhibitoren (Cycloheximid, α -Amanitin) wurde intraperitöneal durchgeführt. Der Wirkstoff war in 0.067 M Tris pH 7.9 oder in 0.9% NaCl gelöst. Den Kontrolltieren wurde ein entsprechendes Volumen des Lösungsmittels verabreicht. Der Einbau radioaktiver Vorstufen in eine bestimmte Zellfraktion wurde ermittelt, indem ein Aliquot dieser Fraktion auf Papierplättchen (4x8 cm, Schleicher und Schüll) pipettiert und in 5% TCA präzipitiert wurde. Die Plättchen wurden fünfmal in 5% TCA gewaschen, anschließend in Methanol, Methanol/Aceton und Äther. Die Einbaurrate der radioaktiven Vorstufe wurde in einem Flüssigkeitsszintillationssystem gemessen (5g PPO, 200 mg POPOP in 1 Liter Toluol).

2.2.3. Bestimmung der Aktivität der RNA Polymerase

RNA Synthese wurde gemessen als ^3H -UTP Einbau in säurefällbare RNA.

Der Testansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 150 μl je 0.18 μMol GTP, CTP, ATP, 0.0018 μMol UTP, 1 μCi $[^3\text{H}]$ -UTP, 1.5 μMol Kreatinphosphat, 5 μg Kreatinphosphokinase, 1.5 μMol β -Mercaptoäthanol, 10 μMol Tris-HCl pH 7.9, 0.5 μMol MnSO_4 und die entsprechende Fraktion der Säulenchromatographie bzw. Kernsuspension. Bei der Bestimmung

der isolierten Polymerase nach Chromatographie wurde außerdem 20 µg ssDNA und bei der RNA Synthese in Kernen 10 µl 1 M NH_4Cl hinzugefügt.

Die Inkubation wurde dann entsprechend den Zeit- und Temperaturangaben durchgeführt und ein Aliquot von 120 µl auf Papierplättchen (4x4 cm; Schleicher und Schüll) pipettiert und sofort in eiskalte 5% TCA präzipitiert. Zur Entfernung nicht eingebauter, radioaktiver Nukleotide und sehr kurzer RNA-Ketten wurden die Plättchen fünfmal mit 5% TCA gewaschen, anschließend in Methanol, Methanol/Aceton und Äther. Die Einbaurrate des radioaktiv markierten Nukleotids wurde in dem gleichen Flüssigkeitsszintillationssystem gemessen wie zuvor angegeben.

Differenzierung von freier und gebundener RNA Polymerase in Kernen:

Um diese beiden Formen der RNA Polymerase getrennt zu erfassen, mußten die Synthesebedingungen variiert werden. Unter den oben angegebenen Bedingungen konnte nur die Synthese durch gebundenes Enzym gemessen werden. RNA Synthese in Gegenwart von poly dAT (0.067 OD/ml) und Actinomycin D (10 µg/ml) erlaubte eine Quantitierung der freien Polymerasen (Yu, 1974). Durch Zugabe von Actinomycin D, das mit der endogenen DNA interkaliert, wurde die Synthese des gebundenen Enzyms blockiert, so daß die Synthese des freien Enzyms an der synthetischen Matriz e poly dAT gemessen werden konnte. Poly dAT enthält kein

Desoxyguanosin und reagiert deshalb nicht mit Actinomycin D (Reich und Goldberg 1964).

2.2.4. Säulenchromatographie

Vor jeder Chromatographie wurde der Austauscher (DEAE-Cellulose, DEAE-Sephadex A-25) entsprechend den Angaben des Herstellers regeneriert. Die mit Austauscher gefüllten Säulen wurden vor dem Beladen mit mehreren Säulenvolumen Puffer II gewaschen. Die Proben wurden mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 20-30 ml/h auf die Säulen aufgetragen, die anschließend mit ungefähr zwei Säulenvolumen Puffer II nachgewaschen wurden. Die Elution der Proteine vom Austauscher erfolgte mit einem linearen Salzgradienten. Da die Elutionsprofile von zwei und auch von vier Säulenchromatographien verglichen werden mußten, war es notwendig, für möglichst identische Elutionsbedingungen zu sorgen. Deshalb wurden die aus einem gemeinsamen Reservoir stammende Gradientenflüssigkeit über getrennte Schläuche mit Hilfe einer einzigen Pumpe auf die Säulen aufgetragen. Der Verlauf des Gradienten wurde verfolgt durch Bestimmung der Salzkonzentration in den einzelnen Fraktionen. Die Chloridbestimmung erfolgte argentometrisch nach Mohr (1856).

Entsprechend dem Verlauf des Gradienten ausgewählte Fraktionen wurden auf Polymeraseaktivität untersucht (S.15). Die Inkubation wurde 60 Minuten bei 37°C (Rattenleber-

zyme) und bei 25°C (Erythrozytenenzyme) durchgeführt.
Für die Normierung der Gruppen wurden folgende Parameter gewählt:

- a) DNA-Bestimmung des Ausgangsmaterials (Chauveaukerne)
und die optische Dichte bei 260 nm des Überstands
nach Ammoniumsulfatfällung.
- b) Fraktionsvolumina der einzelnen Gruppen.
- c) In einigen Fällen wurde der Proteingehalt des Säulen-
auftrags bestimmt (Lowry et al., 1951).

3. Ergebnisse

3.1. Einfluß von Teilhepatektomie auf die RNA Synthese in vivo

Um Ergebnisse der Literatur zu bestätigen (Fujioka et al., 1963), wurde die RNA Synthese nach Teilhepatektomie untersucht. Den Ratten wurde 30 Minuten vor dem Töten (11-12 Stunden nach Operation) [^3H]-Orotsäure injiziert (Methoden) und der Einbau der radioaktiven Vorstufe in das Zellhomogenat und die Kernsuspension gemessen. Da [^3H]-Orotsäure eine Vorstufe für die RNA Synthese darstellt (Synthese der Pyrimidinukleotide), ist der Einbau von [^3H]-Orotsäure ein Maß für die RNA Synthese in vivo. Im Mittel wurde eine Stimulierung der RNA Synthese in vivo um 100% beobachtet.

3.2. Einfluß von Teilhepatektomie auf die RNA Synthese in vitro und die Aktivität isolierter RNA Polyme- rasen im Restlebergewebe.

3.2.1. RNA Synthese in isolierten Kernen 12 Stunden nach partieller Hepatektomie

In isolierten Zellkernen bleibt die Fähigkeit zur RNA Synthese erhalten (Weiss 1960). Die endogene Aktivität ist hauptsächlich auf Elongation von Polymerasemolekülen

zurückzuführen, die während der Isolation an der Matrix gebunden bleiben und an denen schon naszierende RNA-Ketten hängen (Udvardy und Seifart, 1976).

Die RNA Synthese war also in Abwesenheit von poly dAT/Actinomycin D fast ausschließlich auf initiierte Polymerasemoleküle (gebundenes Enzym) zurückzuführen. In Gegenwart von poly dAT/Actinomycin D wurden die freien Polymerasen quantitiert (Methoden).

Abbildungen 1 und 2 zeigen den Verlauf einer Zeitkinetik der RNA Synthese in isolierten Leberzellkernen hepatektomierten Ratten und von Kontrolltieren.

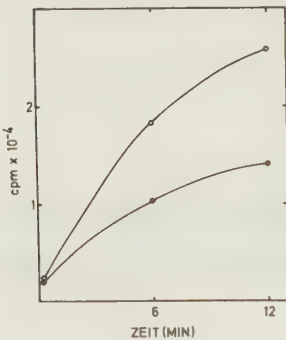


Abbildung 1

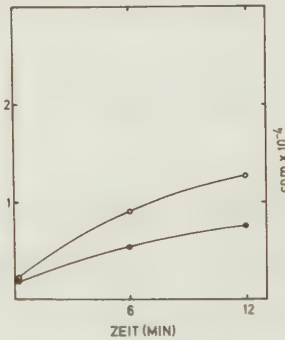


Abbildung 2

RNA Synthese in isolierten Zellkernen aus Leber von Kontrolltieren (●—●) und partiell hepatektomierten Ratten (○—○). Die Inkubation wurde bei 25°C durch-

geführt. Abszisse: Inkubationszeit.

Abb. 1: Synthese in Abwesenheit von poly dAT/AcD

Abb. 2: Synthese in Gegenwart von poly dAT/AcD

Dieser Darstellung (Abb. 1 und 2) liegen quantitative Auswertungen von drei Experimenten zugrunde. Dazu wurden die cpm-Werte für die Punkte 0.5, 6 und 12 Minuten der Zeitkinetik addiert.

Es ergab sich eine Stimulierung der RNA Synthese nach partieller Hepatektomie um den Faktor 1.66 für die Synthese an der hinzugefügten Matrize poly dAT (freies Enzym) und für die Synthese am endogenen Chromatin um den Faktor 1.82.

Unter den angegebenen Versuchsbedingungen zeigte das freie Enzym nur 50-68% der Aktivität des gebundenen Enzyms.

Abbildungen 3 und 4 zeigen exemplarisch das Ergebnis eines Experiments, bei dem die RNA Synthese in Abwesenheit und auch in Gegenwart niedriger und hoher Konzentration von α -Amanitin gemessen wurde. Anwendung des Inhibitors α -Amanitin erlaubt es, die in Kernen stattfindende RNA Synthese den Enzymen A, B und C zuzuordnen (Seifart und Sekeris, 1969; Kedinger et al. 1970; Wilhelm et al., 1974). Bei der Amanitinkonzentration I (0.067 $\mu\text{g/ml}$) wird das B-Enzym vollständig gehemmt, das C-Enzym jedoch weitgehend erhalten. In Gegenwart der Amanitinkonzentration II (133 $\mu\text{g/ml}$) kommt es auch zu einer

vollständigen Hemmung des C-Enzyms, so daß nur noch die Aktivität des A-Enzyms erhalten bleibt.

Außerdem wurde Synthese am Chromatin (gebundenes Enzym) und an poly dAT (freies Enzym) unterschieden.

Dargestellt wurde nur die Synthese des gebundenen Enzyms.

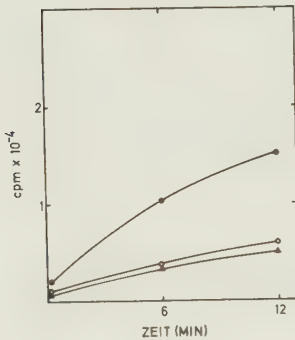


Abbildung 3

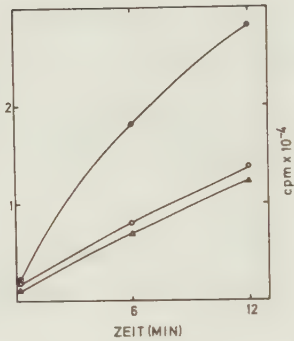


Abbildung 4

RNA Synthese in isolierten Zellkernen aus Lebern von Kontrolltieren (Abb.3) und partiell hepatektomierten Tieren (Abb.4). Die Inkubation wurde bei 25°C in Gegenwart von Amanitinkonzentration I (0.067 µg/ml; ○—○), Amanitinkonzentration II (133 µg/ml; ▲—▲) und in Abwesenheit von α-Amanitin (●—●) durchgeführt.

Abszisse: Inkubationszeit

Die Ergebnisse von drei Experimenten wurden rechnerisch zusammengefaßt, indem die Werte für die Punkte der Zeit-

kinetik 0.5, 6 und 12 Minuten addiert wurden. Entsprechend der Hemmbarkeit wurde den einzelnen Enzymen RNA Synthese zugeordnet.

A-Enzym: Amanitinresistente Synthese

B-Enzym: Gegenüber Amanitinkonzentration I sensitive Synthese, die sich aus der Differenz zwischen gesamter RNA Synthese und Synthese in Gegenwart von Amanitinkonzentration I berechnet wurde.

C-Enzym: Gegenüber Amanitinkonzentration II sensitive Synthese nach erfolgter Hemmung des B-Enzyms. Sie wurde ermittelt aus der Differenz zwischen RNA Synthese in Gegenwart von α -Amanitinkonzentration I und Amanitinkonzentration II.

Da die addierten cpm der Zeitkinetik selbst keine Aussagekraft besitzen, wird in der folgenden Tabelle nur angegeben, um welchen Faktor die RNA Synthese in Zellkernen regenerierender Rattenleber gegenüber der Kontrolle angestiegen war (Mittelwerte aus drei Experimenten).

	RNA Synthese TH / K	
	gebundenes E.	freies E.
A-Enzym	2.50	1.79
B-Enzym	1.52	1.61
C-Enzym	1.42	1.65

TH = Teilhepatektomie

K = Kontrolle

3.2.2. Einfluß unterschiedlicher Regenerationszeiten
auf die RNA Synthese in isolierten Kernen

Um diese Frage zu untersuchen, wurden Ratten partiell hepatektomiert und entweder 1,2,3 oder 5 Stunden danach geschlachtet. Die RNA Synthese in isolierten Kernen wurde in Gegenwart von poly dAT (ohne Actinomycin D) zur Ermittlung der gesamten Synthese durch gebundenes und freies Enzym durchgeführt. Für die Abbildung 5 wurden die cpm der Zeitkinetik (0,5, 6 und 12 Minuten) addiert.

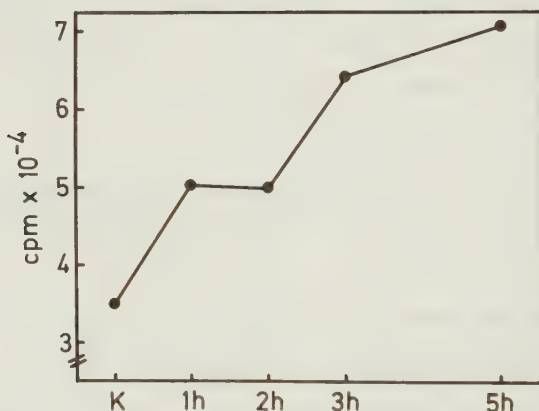


Abbildung 5

Einfluß unterschiedlicher Regenerationszeiten auf die RNA Synthese in isolierten Kernen.

K = Kontrolle

1 h = partiell hepatektomierte Ratten - 1 Stunde Regenerationszeit

2 h = 2 Stunden Regenerationszeit u.s.w.

Inkubation bei 25°C in Gegenwart von poly dAT.

Abszisse : Inkubationszeit

Aus der Abb.5 ist ersichtlich, daß die gesamte RNA-Synthese schon eine Stunde nach Teilhepatektomie im restlichen Lebergewebe um ca. 30% stimuliert war. Die Stimulierung, die sich für TH gegenüber K ergab, erhöhte sich mit zunehmender Regenerationszeit.

Die Ergebnisse aus diesem Experiment sind der folgenden Tabelle zugrunde gelegt.

Stunden nach Teilhepatektomie	RNA Synthese Teilhepatektomie / Kontrolle
1	1.30
2	1.45
3	1.85
5	2.00

Bestimmung der RNA Synthese in Gegenwart von Amanitin-konzentration I und II (siehe S. 20) ermöglichte die Berechnung der amanitinsensitiven und der amanitinresistenten Synthese (Abbildung 6).

Aus der Abbildung 6 geht hervor, daß die Stimulierung, die kurze Zeit nach Teilhepatektomie erfolgte, hauptsächlich auf die amanitinsensitive, vom B-Enzym katalysierte RNA Synthese zurückzuführen war. Die amanitinresistente RNA Synthese durch A-Enzym stieg erst 3-4 Stunden nach der Operation signifikant an.

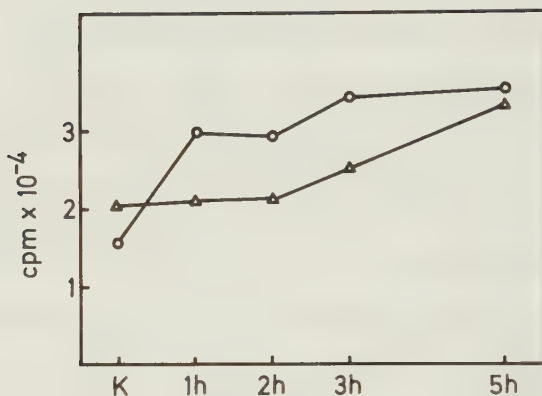


Abbildung 6:

Einfluß unterschiedlicher Regenerationszeiten auf die amanitinsensitive und amanitinresistente RNA Synthese in isolierten Kernen.

K = Kontrolle

1 h = 1 Stunde Regenerationszeit u.s.w.

○—○ amanitinsensitive Synthese, durch Amanitinkonzentration I (0.067 µg/ml) hemmbar

△—△ amanitinresistente Synthese in Gegenwart von Amanitinkonzentration II (133 µg/ml)

Inkubation bei 25°C in Gegenwart von poly dAT.

3.2.3. Isolierung von Polymerase A, B und C aus Leberzellen hepatektomierter Ratten und von Kontrolltieren.

3.2.1. Einfluß der Regenerationszeit

Die in der Abbildung 5 dargestellten Ergebnisse zeigten bereits eine Stunde nach der Operation einen Anstieg der RNA Synthese in isolierten Kernen. Daher wurde zunächst untersucht, zu welchem Zeitpunkt nach Teilhepatektomie eine Aktivitätssteigerung der isolierten Polymerase zu beobachten ist. Es wurde ein Regenerationszeitraum von 2 und 5 Stunden gewählt. Es wurden nur jeweils 3 Tiere operiert, um den angegebenen Regenerationszeitraum möglichst genau einzuhalten. Die Enzymextrakte wurden auf DEAE-Cellulose Säulen aufgetragen und anschließend die Proteine mit einem Ammoniumchloridgradienten eluiert. Die Bestimmung der Enzymaktivität ergab ein zweigipfeliges Profil (Abb.7).

Der erste Aktivitätsgipfel umfaßt A- und C-Enzym, deren Elutionspunkte bei diesem Austauscher zusammenfallen. Der zweite Peak stellt B-Enzymaktivität dar. Die Aktivitätsprofile wurden im Gegensatz zu allen anderen Experimenten nach dem Proteingehalt des Säulenauftrags normiert.

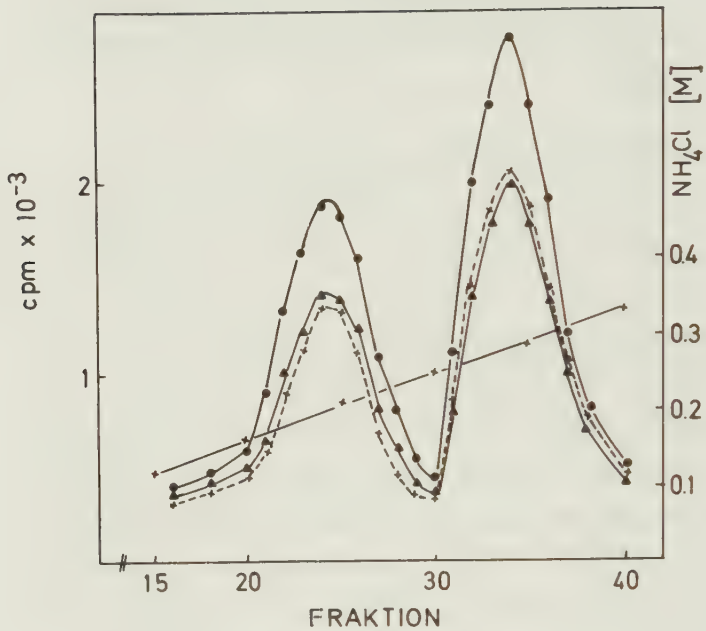


Abbildung 7.

DEAE-Cellulose Chromatographie der RNA Polymeraseaktivitäten der Zellkerne von Kontrolltieren (▲—▲) und partiell hepatektomierten Ratten (x---x 2 Stunden Regenerationszeit, ●—● 5 Stunden Regenerationszeit).

Säulengröße : 2.2 x 6.2 cm

Gradient : 2 x 75 ml

0.0 - 0.35 M NH₄Cl in Puffer II

x—x NH₄Cl Konzentration (M)

Eine rechnerische Zusammenfassung der in Abb.7 dargestellten Ergebnisse ist in folgender Tabelle aufgeführt.

Enzymaktivität (cpm)			
	Kontrolle	2 h	5 h
(A+C)-Bereich	6615	5600	8979
B-Enzym	8885	9185	12070

Zur Ergänzung dieses Versuchs wurde die aus regenerierender Rattenleber (3 Stunden Regenerationszeit) isolierte Polymeraseaktivität bestimmt.

Enzymaktivität (cpm)		
	Kontrolle	3 h
(A+C)-Bereich	8733	8303
B-Enzym	12315	14228

Aus den Ergebnissen dieser beiden Experimente geht hervor, daß drei Stunden nach Teilhepatektomie keine Erhöhung der Aktivität im Bereich des (A+C)-Enzyms beobachtet werden konnte. Die Aktivität des B-Enzyms war jedoch zu diesem Zeitpunkt schon signifikant (16%) gegenüber der Kontrolle erhöht. 5 Stunden nach partieller Hepatektomie waren die Aktivitäten von (A+C)-Enzym und

von B-Enzym deutlich stimuliert.

Da bekannt ist, daß eine große Menge des C-Enzyms im Cytoplasma lokalisiert ist (Seifart und Benecke, 1972), war es unabdingbar, diese Enzymaktivität zu erfassen. Die Aktivität der cytoplasmatischen Polymerase C wurde in regenerierender Rattenleber 5 Stunden nach Operation untersucht. Sie zeigte erstaunlicherweise eine Reduktion um 10% gegenüber der Kontrolle.

3.2.3.2. RNA Polymerasen A, B und C aus Leberzellen 12 Stunden nach Teilhepatektomie

Für die weiteren Isolierungen der RNA Polymerasen wurde immer ein Zeitraum von 12 Stunden zwischen Operation und Entnahme der Restleber gewählt. Zu diesem Zeitpunkt war noch keine vermehrte DNA Synthese eingetreten, so daß man bei der Präparation des Ausgangsmaterials der Gruppen K und TH von gleichen Zellpopulationen ausgehen konnte. Deshalb konnte der DNA-Gehalt zur Normierung experimentell bedingter Fehler in den Ausgangsmengen der Gruppen K und TH herangezogen werden.

DEAE-Sephadex A-25 Chromatographie der Kernpolymerasen

Ziel der Chromatographie des Enzymextraktes aus Kernen sollte sein, Änderungen der Enzymaktivität im Restlebergewebe 12 Stunden nach Operation festzustellen. Da bekannt war, daß die Polymerasen A, B und C mit Ammoniumsulfat

von DEAE-Sephadex A-25 getrennt eluiert werden können, wurde zunächst dieser Austauscher verwendet.

Die Chromatographie ergab ein Aktivitätsprofil mit ca. 10 Peaks. Dieses Elutionsmuster war reproduzierbar. Es ist jedoch nicht bekannt, ob diese Aktivitätsgipfel heterogene Formen der Polymerasen darstellten oder ob sie experimentell bedingt waren. Das eigentliche Ziel, eine quantitative Aussage über die Stimulierung der Aktivitäten von A-, B- und C-Enzym zu machen, konnte hiermit nicht erreicht werden.

DEAE-Cellulose Chromatographie der Kernpolymerasen

Um die Stimulierung der Enzymaktivitäten 12 Stunden nach Teilhepatektomie genau berechnen zu können, wurde der Enzymextrakt an DEAE-Cellulose chromatographiert. Die Elution wurde mit einem linearen Ammoniumchloridgradienten durchgeführt. Wie bereits erwähnt, haben A- und C-Enzym unter diesen Bedingungen einen fast identischen Elutionspunkt (Molarität der Chloridionen 0.2), der sich deutlich von dem des B-Enzyms unterscheidet (Molarität der Chloridionen 0.28).

Bedingt durch die komplizierte Versuchsanordnung beobachtete man eine gewisse Schwankung der Ergebnisse, die durch das Tiermaterial aber auch durch methodisch-technische Fehler bedingt ist. Daher wurde dieser Versuch fünfmal wiederholt. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle

dargestellt. Die Stimulierung der Gruppe TH gegenüber der Kontrolle wurde aus den cpm-Werten über dem Aktivitätsgipfel berechnet. DNA-Bestimmungen des Ausgangsmaterials wurde in die Berechnungen miteinbezogen.

Experiment No.	Stimulierung im (A+C)-Bereich	Stimulierung des B-Enzyms
1	2.16	1.23
2	2.49	1.30
3	1.77	1.33
4	2.28	
5	1.63	1.46
Mittelwert	2.00	1.30

Die Mittelwerte bildeten die Grundlage für die Abb.8.

12 Stunden nach partieller Hepatektomie war der Aktivitätsbereich, der A- und C umfaßte, um ca. 100% stimuliert. Der zweite Aktivitätsgipfel, der auf B-Enzym zurückzuführen war, hatte zu diesem Zeitpunkt eine Zunahme um ca. 30% erreicht.

Die in vitro gemessene Enzymaktivität konnte auch durch Faktoren beeinflußt worden sein, die nicht fest mit dem Polymerasemolekül assoziiert waren. Unterschiedliche Mengen inhibierender bzw. stimulierender Faktoren oder degradierender Enzyme (RNAsen, Proteinasen) konnten möglicherweise die Polymeraseaktivität verändern.

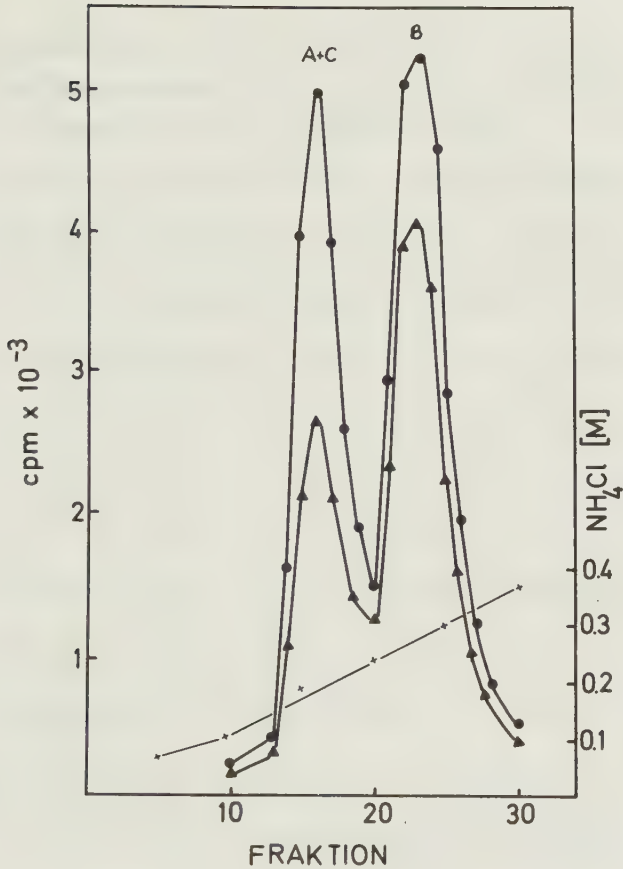


Abbildung 8: DEAE-Cellulose Chromatographie der RNA Polymeraseaktivitäten der Zellkerne von Kontrolltieren (▲—▲) und partiell hepatektomierten Ratten (○—○). 12 Stunden Regeneration.

Säulengröße: 2.2 x 6.2 cm

Gradient: 2 x 65 ml; 0.0 - 0.35 M NH₄Cl in Puffer II

x—x NH₄Cl Konzentration (M)

Um die stimulierte Enzymaktivität nach Teilhepatektomie zu charakterisieren, wurden dem (A+C)-Bereich nach DEAE-Cellulose der Gruppen K und TH Aliquots entnommen und sowohl getrennt als auch in einem Mischungsverhältnis von 1:1 inkubiert. Die Summe der Enzymaktivitäten in den getrennt inkubierten Aliquots von K und TH entsprach der Enzymaktivität der gemeinsam inkubierten Aliquots. Ein Faktor, der nicht mit dem Polymerasemolekül assoziiert war, konnte also nicht die Ursache der Stimulierung nach Teilhepatektomie sein; denn bei einer gemischten Inkubation würde dieser Faktor auch die Polymeraseaktivität der Kontrolle beeinflussen.

Die Enzymaktivität im (A+C)-Bereich nach DEAE-Cellulose wurde dreimal im Abstand von 24 Stunden untersucht. Dabei zeigte sich, daß die induzierte Enzymaktivität nicht schneller abnahm als die der Kontrolle. Dieses Ergebnis spricht dagegen, daß die induzierte Enzymaktivität nach Teilhepatektomie auf unterschiedliche Konzentrationen an RNAsen und Proteinasen zurückzuführen war.

DEAE-Sephadex A-25 Chromatographie des (A+C)-Bereichs

Zu Trennung des gemeinsamen (A+C)-Bereichs nach DEAE-Cellulose in die einzelnen Enzyme wurden die entsprechenden Fraktionen vereinigt, gegen Puffer II dialysiert und nach Überprüfung der Chloridionenkonzentration (unter 0.1 M) auf einer DEAE-Sephadex A-25 getrennt (Abb.9). Das A-Enzym eluiert unter diesen Bedingungen bei einer

Chloridionenkonzentration von 0.22 M, das C-Enzym bei 0.33 M. Da das C-Enzym von DEAE-Sephadex zusammen mit B-Enzym eluiert, wurde der Aktivitätsbereich des C-Enzyms mit α -Amanitin (0.67 $\mu\text{g/ml}$) auf Kontamination mit B-Enzym untersucht, das möglicherweise bei der DEAE-Cellulose Chromatographie nicht vollständig vom (A+C)-Bereich abgetrennt worden war. Bei der Kalkulation der vorhandenen C-Enzymaktivität mußte die Hemmung des C-Enzyms bei dieser Amanitinkonzentration um ca. 20% miteinbezogen werden.

Die Rechromatographie des (A+C)-Bereichs an DEAE-Sephadex ergab, daß die Stimulierung nach Teilhepatektomie auf ein Ansteigen der Menge beider Enzyme zurückzuführen war. Den Werten der folgenden Tabelle sind die entsprechend den DNA-Bestimmungen korrigierten cpm-Werte über den Aktivitätsgipfel zugrunde gelegt.

Experiment No.	Stimulierung des A-Enzyms	Stimulierung des C-Enzyms
1	1.30	1.20
2	2.97	1.54
3	1.76	1.00
4	2.05	1.49
Mittelwert	2.02	1.30

Der Mittelwert bildete die Grundlage für die Abb.9.

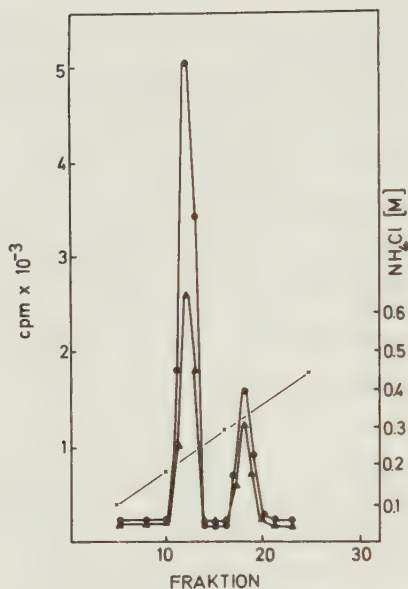


Abbildung 9: DEAE-Sephadex Chromatographie der RNA Polymeraseaktivitäten des (A+C)-Bereichs nach DEAE-Cellulose (Abb.8).

▲—▲ Kontrolle

●—● Teilhepatektomie

Säulengröße: 1.6 x 7 cm

Gradient : 2 x 45 ml (pro Säule); 0.0-0.55 M NH₄Cl in
Puffer II; x—x NH₄Cl Konzentration (M)

Die starke Streuung innerhalb der Werte für die Stimulierung des A- und C-Enzyms war wahrscheinlich auf methodisch-technische Fehler zurückzuführen.

DEAE-Cellulose Chromatographie des partikelfreien Überstands

Der partikelfreie Überstand aus Zellen regenerierender Rattenleber (12 Stunden Regenerationszeit) und aus Lebern aus Kontrolltieren (siehe Methoden) wurde an DEAE-Cellulose chromatographiert und damit die im Cytoplasma enthaltene Polymerase C bestimmt (Abb.10). Diese Chromatographie wurde mit cytoplasmatischen Überständen mehrerer Präparationen wiederholt.

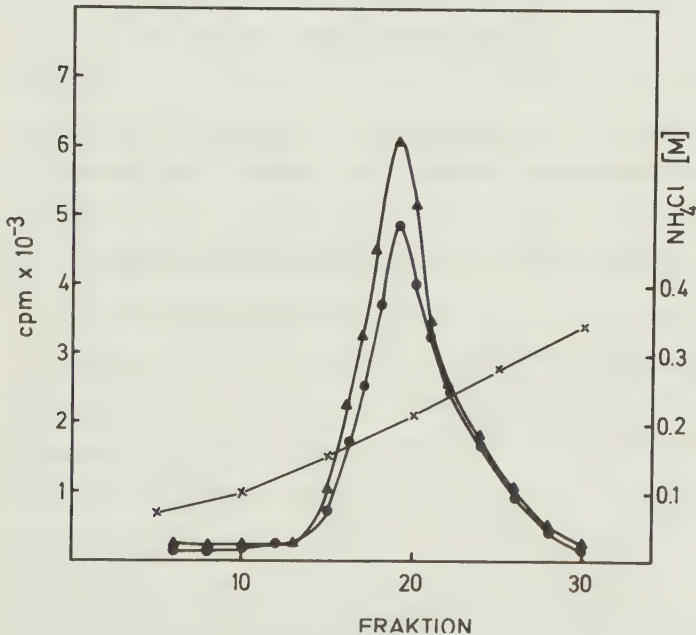


Abbildung 10:

Legende zur Abbildung 10

DEAE-Cellulose Chromatographie der RNA Polymeraseaktivitäten des partikelfreien Überstands, gewonnen aus Leberzellen von Kontrolltieren (▲—▲) und partiell hepatektomierter Ratten (●—●). 12 Stunden Regenerationszeit. Die cpm wurden nach dem Proteingehalt des Säulenauftrags der Gruppen K und TH normiert.

Säulengröße : 3.2 x 4.5 cm

Gradient : 0.0 - 0.45 M NH_4Cl in Puffer II
2 x 100 ml (pro Säule)
x—x NH_4Cl Konzentration (M)

Im Gegensatz zu dem C-Enzym im Kern zeigte das im Cytoplasma vorkommende C-Enzym keine gesteigerte Aktivität 12 Stunden nach partieller Hepatektomie, sondern es war in seiner Aktivität um durchschnittlich 20% reduziert.

Da bekannt war, daß nach weiterer Reinigung eine Aufspaltung des einheitlichen Enzympeaks nach DEAE-Cellulose Chromatographie möglich ist, wurde das cytoplasmatische C-Enzym anschließend an DNA-Agarose chromatographiert und dadurch von nicht an DNA bindenden Proteinen befreit. Von DNA-Agarose eluierte das C-Enzym in zwei Aktivitätsbereichen. Das C-Enzym des ersten Bereichs war teilweise auch ohne exogene DNA in Enzymtest aktiv, die Enzymaktivität des zweiten Gipfels hingegen war von der exogenen Matrize abhängig. An die DNA-Agarose schloß sich eine

Chromatographie an DEAE-Sephadex A-25 an.

Von diesem Austauscher eluierte das C-Enzym in zwei Aktivitätspeaks. Soweit die geringen Enzymaktivitäten nach diesen Chromatographieschritten eine Aussage erlaubten, schien die Reduktion in der Gruppe TH in beiden Aktivitätsgipfeln gleichmäßig aufzutreten. Ob diese beiden Peaks heterogene Formen der cytoplasmatischen Polymerase C bedeuteten, wurde nicht weiter untersucht, da die Enzymaktivitäten nach diesen Reinigungsschritten im Verhältnis zu den Ausgangsaktivitäten gering waren und eine Rechromatographie der einzelnen Peaks nicht möglich war. Inzwischen gibt es Hinweise, daß die beiden Aktivitätspeaks auf zwei Polymerasen zurückzuführen sind, die sich in ihrem Verhalten gegenüber α -Amanitin unterscheiden.

3.2.3.3. Einfluß von Cycloheximid auf die Enzymaktivität nach Teilhepatektomie

Die Erhöhung der Aktivität der isolierten Polymerasen 12 Stunden nach Teilhepatektomie konnte durch neu synthetisiertes Enzym zustande gekommen sein oder auf einer Aktivierung bereits vorhandener inaktiver Polymerasemoleküle beruhen.

In den folgenden Experimenten wurde Cycloheximid, ein Hemmstoff der Proteinsynthese, angewendet, um Neusynthese von Enzym zu unterbinden.

Die Tiere wurden nur während der letzten beiden Stunden

der 12-stündigen Regenerationszeit dem Inhibitor ausgesetzt. Dadurch sollte untersucht werden, ob der Inhibitor während dieser Zeit die zu erwartende weitere Stimulierung der Enzymaktivität blockierte oder ob er möglicherweise auch eine Wirkung auf die bereits stimulierte Enzymaktivität ausübte.

Da es sich um eine sehr vielschichtige Frage handelte, mußten zusätzliche Kontrollen mit aufgenommen werden. Insgesamt wurden vier Gruppen untersucht. Die Gruppe TH umfaßte Tiere, die 10 Stunden nach Teilhepatektomie getötet wurden. Diesen Tieren sowie den Ratten der Kontrollgruppe wurde kurz vor dem Töten Cycloheximid ($400 \mu\text{g}/100\text{g}$) injiziert, um unspezifische Effekte von Cycloheximid zu erfassen. Den Ratten der Gruppe TH + CHI wurde 10 Stunden nach partieller Hepatektomie Cycloheximid ($400 \mu\text{g}/100 \text{ g}$) in vivo intraperitoneal appliziert, so daß während der letzten beiden Stunden der Regenerationszeit die Proteinsynthese gehemmt war. Die entsprechende Kontrollgruppe bestand aus nicht operierten Tieren, denen auch zwei Stunden vor dem Töten Cycloheximid ($400 \mu\text{g}/100\text{g}$) injiziert worden war. Diese Gruppe war notwendig, um einen Effekt der Proteinsynthesehemmung auf nicht stimulierte Enzymaktivität zu erkennen.

Eine Gruppe umfaßte 5 Tiere. Es wurden Kerne und cytoplasmatischer Überstand präpariert.

Das folgende Schema soll noch einmal den zeitlichen Ab-

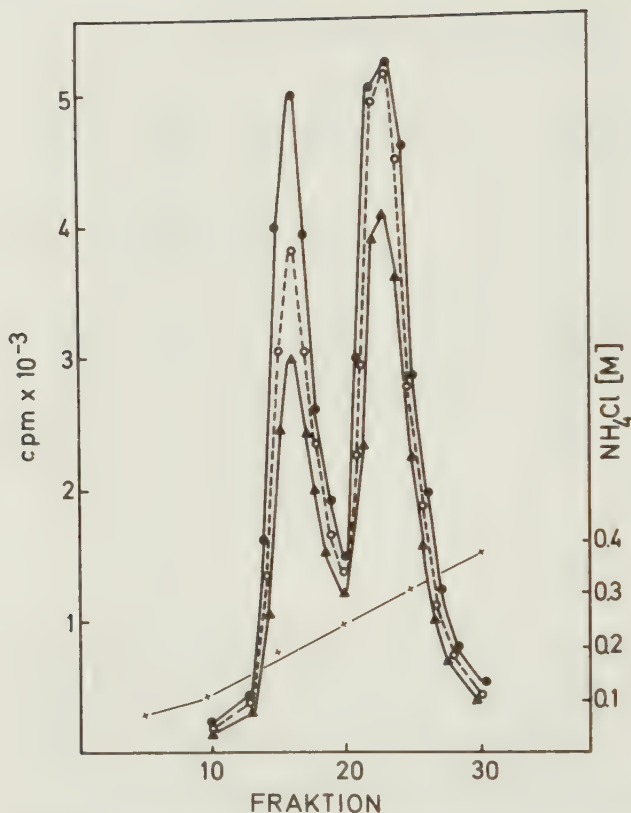


Abbildung 11: DEAE-Cellulose Chromatographie der RNA Polymeraseaktivitäten der Zellkerne von Kontrolltieren (▲—▲), hepatektomierter Ratten (●—●) und cycloheximidbehandelter, hepatektomierter Ratten (o---o). Das Aktivitätsprofil der RNA Polymerasen aus Kernen cycloheximidbehandelter Kontrolltiere ist nicht dargestellt. Säulengröße und Gradient wie in Abb.9.

Stunden nach Teilhepatektomie um ca. 70% stimuliert war. Entsprechend den Ergebnissen von Seite 35 wäre in weiteren zwei Stunden eine Steigerung bis auf ca. 100% zu erwarten. Es zeigte sich jedoch, daß bei Hemmung der Proteinsynthese nicht nur eine weitere Stimulierung von 70% bis auf 100% ausblieb, sondern daß sogar nur eine Reststimulierung von 30% zu verzeichnen war. Bei diesen Berechnungen wurde bereits berücksichtigt, daß eine geringe Reduktion der Enzymaktivität von 5-10% des (A+C)-Bereichs auch in der Gruppe I + CHI auftrat.

Die B-Enzymaktivität, die 10 Stunden nach Teilhepatektomie um 30% angestiegen war, blieb unverändert in den zwei folgenden Stunden der Regenerationszeit in Gegenwart von Cycloheximid.

Rechromatographie des (A+C)-Bereichs an DEAE-Sephadex A-25 zur Auftrennung in A- und C-Enzym zeigte, daß nach Cycloheximid in beiden Enzymen eine Reduktion eingetreten war. Die Restaktivität war für das A- und C-Enzym ungefähr identisch.

b) Aktivität der cytoplasmatischen Polymerase C

10 Stunden nach Teilhepatektomie war die Aktivität der cytoplasmatischen Polymerase C in der regenerierenden Rattenleber um ca. 20% der Kontrolle abgefallen. Injektion des Inhibitors Cycloheximid 10 Stunden nach Teilhepatektomie bewirkte, daß die Reduktion der Enzymaktivität zwei Stunden später wieder aufgehoben war.

3.2. RNA Synthese und Aktivität isolierter Polymerasen in Entenerythrozyten unterschiedlichen Differenzie- rungsgrades

3.2.1. RNA Synthese in isolierten Erythrozytenkernen

Blut normaler und anämischer Enten diente als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von Erythrozyten, aus denen Zellkerne isoliert wurden (Methoden).

Die RNA Synthese wurde in isolierten Kernen durch den Einbau von $[^3\text{H}]$ -UTP bestimmt. Um nur korrekt initiierte Polymerasemoleküle zu erfassen und gleichzeitig Reinitiation zu verhindern, wurde dem Inkubationsansatz Heparin (2 mg/ml Endkonzentration) hinzugefügt (Cox, 1976). Heparin hat nicht nur die Eigenschaft, Polymerasemoleküle zu inhibieren, die nicht fest in einem Initiationskomplex an die DNA gebunden sind, sondern es verhindert auch Reinitiation. Da es in Gegenwart von Heparin zur Dissoziation von chromosomalen Proteinen von der DNA kommt, werden auch Polymerasemoleküle erfaßt, die zwar korrekt auf dem Genom initiiert, aber in ihrer Elongation durch chromosomale Strukturen gehemmt waren. Außerdem hat Heparin einen hemmenden Einfluß auf die Aktivität von RNAsen (Palmiter 1973), die in diesem System in erheblichem Umfang vorhanden sind (Versuche mit radioaktiv markierter RNA). Die RNA Synthese in vitro wurde in Abwesenheit und in Gegenwart von α -Amanitin (0.67 $\mu\text{g/ml}$)

durchgeführt. Diese Amanitinkonzentration bewirkt eine vollständige Hemmung des B-Enzyms und eine teilweise Hemmung des C-Enzyms.

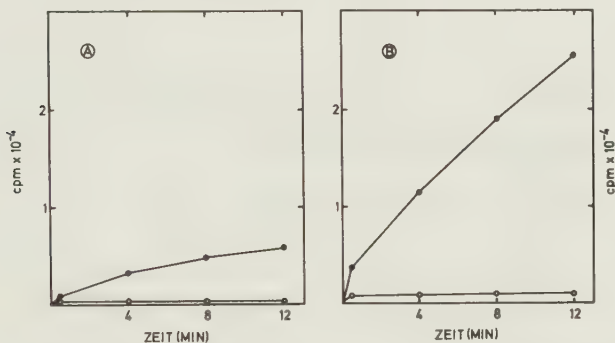


Abbildung 12:

RNA Synthese in Erythrozytenkernen, isoliert aus dem Blut normaler Enten (Teil A) und anämischer Enten (Teil B). Inkubation bei 25°C in Gegenwart von Heparin (2 mg/ml).

●—● Synthese in Abwesenheit von α -Amanitin

○—○ Synthese in Gegenwart von α -Amanitin (0.67 μ g/ml).

Abszisse : Inkubationszeit.

Isolierte Kerne unreifer Erythrozyten zeigten eine um den Faktor 4 höhere RNA Synthese als Kerne, die aus reifen Erythrozyten gewonnen worden waren. In reifen und in polychromatischen Erythrozyten war in Gegenwart einer Konzentration von α -Amanitin, bei der nur A-Enzym und

teilweise C-Enzym aktiv sind, keine RNA Synthese zu beobachten. In Kernen von polychromatischen Erythrozyten war zwar in geringem Umfange Einbau von $[^3\text{H}]$ -UTP zu verzeichnen, der aber während der Inkubation nicht weiter zunahm.

3.2.2. Isolierung von Polymerasen aus Erythrozyten normaler und anämischer Enten

3.2.2.1. RNA Polymerasen aus ganzen Zellen

Die aus reifen Erythrozyten isolierte Enzymaktivität wurde an DEAE-Cellulose chromatographiert (Abb.13). Aus der Abbildung 13 ist ersichtlich, daß diese Zellen vorwiegend B-Enzym enthalten. Aufgrund des Verhaltens gegenüber α -Amanitin ($133 \mu\text{g/ml}$) konnte außerdem festgestellt werden, daß die Polymeraseaktivität den Enzymen A, B und C zugeordnet werden konnte. Die Aktivität der Enzyme A und C betrug allerdings nur ungefähr 10% der gesamten Polymeraseaktivität; die restliche Enzymaktivität war auf B-Enzym zurückzuführen.

Dagegen zeigte die aus polychromatischen Erythrozyten isolierte Polymeraseaktivität nach DEAE-Cellulose einen zweigipfeligen Verlauf (Abb.13). Aktivitätsbestimmung in Gegenwart von α -Amanitin ($0.67 \mu\text{g/ml}$) zeigte, daß neben B-Enzym deutliche Mengen von A-Enzym und wahrscheinlich auch von C-Enzym enthalten waren. Das Verhältnis (A+C) : B betrug 0.7:1. In polychromatischen Ery-

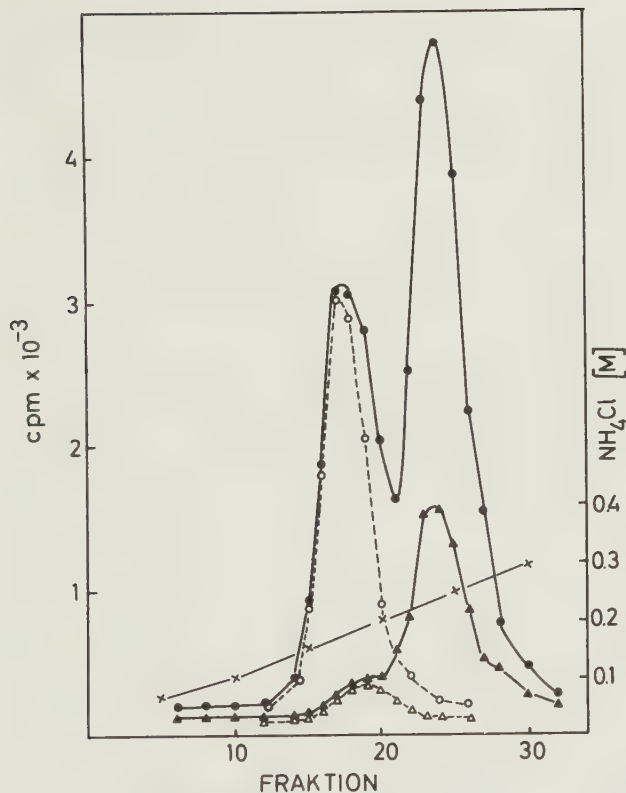


Abbildung 13:

DEAE-Cellulose Chromatographie der RNA polymeraseaktivitäten ganzer Erythrozyten aus dem Blut normaler Enten (▲—▲, △—△ in Gegenwart von α -Amanitin 0.67 μ g/ml) und anämischer Enten (●—●, ○—○ in Gegenwart von α -Amanitin 0.67 μ g/ml).

Säulengröße : 2.2 x 6.2 cm

Gradient : 2 x 50 ml (pro Säule); 0.0-0.35 M NH₄Cl

in Puffer II x—x NH₄Cl Konzentration (M)

throzyten waren insgesamt höhere Enzymspiegel als in reifen Erythrozyten zu beobachten.

Ein Vergleich der Enzymaktivitäten in unreifen Erythrozyten mit denen in reifen Erythrozyten zeigte eine Aktivitätsabnahme der Enzyme A, B und C im Verlauf der Differenzierung. Dieser Abfall war jedoch für das A- und C-Enzym stärker ausgeprägt als für das B-Enzym.

DEAE-Sephadex A-25 Chromatographie des (A+C)-Bereichs
(polychromatische Erythrozyten)

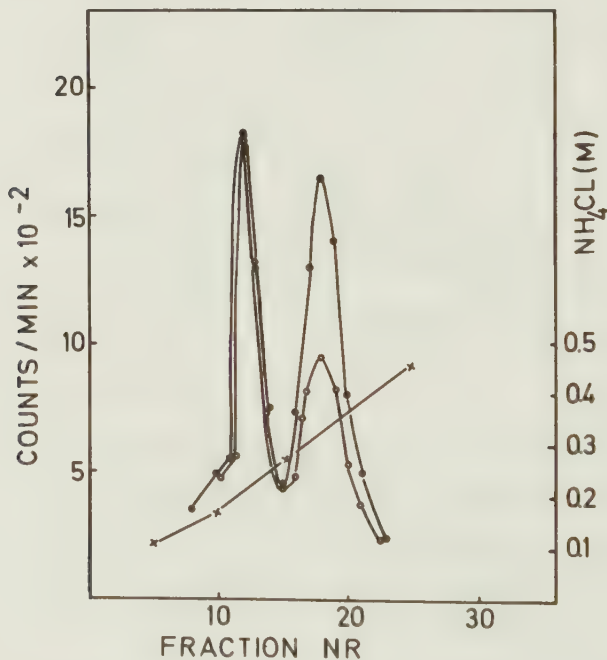


Abbildung 14:

Legende zu Abb. 14.

DEAE-Sephadex Chromatographie der RNA Polymeraseaktivität des (A+C)-Bereichs nach DEAE-Cellulose (Abb.13); Ausgangsmaterial: Erythrozyten aus dem Blut anämischer Enten.

●—● in Abwesenheit von α -Amanitin

○—○ in Gegenwart von α -Amanitin (0.67 μ g/ml)

Säulengröße und Gradient wie in Abb.9 angegeben.

Das in polychromatischen Erythrozyten enthaltene A- und C-Enzym, das nach DEAE-Cellulose gemeinsam eluierte, wurde durch Rechromatographie an DEAE-Sephadex A-25 in A- und C-Enzym aufgetrennt.

Der Enzymtest in Gegenwart von α -Amanitin ergab, daß beide Enzyme in deutlichen Mengen vorhanden waren (Abb. 14).

3.2.2.2. RNA Polymerasen aus isolierten Zellkernen

Die Isolierung der Polymerasen wurde auch aus Kernen vorgenommen, die aus den Blut anämischer Enten gewonnen worden waren.

Chromatographie des Enzymextrakts an DEAE-Cellulose ergab, daß das Verhältnis der Enzyme (A+C) : B ungefähr dem entsprach, das man nach Chromatographie für aus ganzen Zellen isolierte Enzyme feststellen konnte (Abb.15).

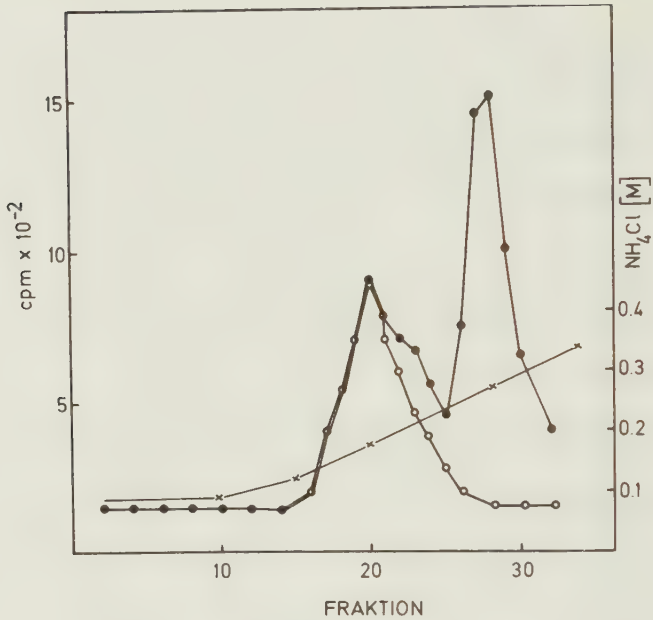


Abbildung 15:

DEAE-Cellulose Chromatographie der Polymeraseaktivitäten
isolierter Zellkerne aus dem Blut anämischer Enten

●—● in Abwesenheit von α-Amanitin

○—○ in Gegenwart von α-Amanitin (0.67 µg/ml)

Säulengröße : 2.2 x 6 cm

Gradient : 2 x 40 ml

0.0-0.35 M NH₄Cl in Puffer II

x—x NH₄Cl Konzentration (M)

Diskussion

In den einzelnen Zellen eines Organismus wird nur ein Teil der im Genom enthaltenen Information exprimiert. Kontrolle dieser differentiellen Genexpression führt dazu, daß in den Zellen des Organismus während einzelner Entwicklungsstadien eine bestimmte Menge spezifischer Proteine synthetisiert wird. Hybridisierungsexperimente haben gezeigt, daß in Zellen von Säugern nur 5-15% des Genoms transkribiert werden (Marushige und Bonner, 1966; Hahn und Laird, 1971).

Während unumstritten ist, daß bei der Embryonalentwicklung und anderen Differenzierungsvorgängen eine Transkriptionskontrolle stattfindet, wird bei Veränderungen der Wachstumsrate eines differenzierten Zellverbandes auch eine posttranskriptionelle Kontrolle diskutiert (Williams und Perman, 1975; Getz et al., 1975).

Kontrolle auf der Ebene der Transkription wird wahrscheinlich durch mehrere Faktoren bewirkt. Einerseits trägt der komplizierte Aufbau des Chromatins zur differentiellen Genexpression bei, andererseits hat die Existenz multipler RNA Polymerasen (Roeder, 1969), die sich strukturell und funktionell unterscheiden, zur Folge, daß spezifische Transkription zum Teil auch durch die Enzyme der einzelnen Klassen erreicht wird.

Unterschiedliche RNA-Syntheseraten für die einzelnen RNA-Klassen (rRNA, hnRNA, niedermolekulare RNAs) findet man in Geweben als Antwort auf einen spezifischen Reiz. Da

die einzelnen RNA-Spezies durch unterschiedliche Polymerasen synthetisiert werden, stellt sich die Frage, ob bei diesen Veränderungen der Genaktivität auch eine Variation in der Konzentration der einzelnen Enzymklassen zu beobachten ist. Während bei Differenzierungsvorgängen mit ausgeprägten qualitativen Veränderungen der RNA Synthese gleichbleibende Mengen entsprechender Polymerasen beobachtet wurden (Roeder, 1974a; Pong und Loomis, 1973), konnte bei Stimulierung von Wachstumsvorgängen in differenzierten Geweben mit zumeist quantitativen Veränderungen der RNA Synthese stark variierende Mengen entsprechender Polymerasen nachgewiesen werden (Jaehning et al., 1975; Sebastian et al., 1973; Yu, 1975).

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden zwei Zellsysteme gewählt, die als Reaktion auf einen exogenen Stimulus eine Steigerung der RNA Synthese zeigen, nämlich ein Wachstumsprozeß (regenerierende Rattenleber) und ein Differenzierungsvorgang (Entenerythrozyten). Die Ergebnisse sollen zunächst getrennt diskutiert werden.

Die Untersuchungen in isolierten Leberzellkernen ergaben, daß die RNA Synthese am endogenen Chromatin 12 Stunden nach Teilhepatektomie um den Faktor 1.8 gegenüber der Kontrolle angestiegen war. Die Inkorporation beruhte aber nicht auf Veränderungen der spezifischen Aktivität der markierten Vorstufe (^3H -UTP). Fujioka et al. (1963) konnten zeigen, daß die Menge des freien Nukleotids in der Zelle nach Hepatektomie nur geringfügig zunahm.

Da ein Einbau von $[^3\text{H}]$ -Orotsäure, der ein Maß für die RNA Synthese in vivo darstellt, in entsprechendem Ausmaße stimuliert war, konnte man annehmen, daß die Ergebnisse der RNA Synthesestudien in vitro den Zustand in vivo widerspiegeln. Die Anwendung des Matrizenblockers Actinomycin D ermöglichte es, die Synthese der am endogenen Chromatin initiierten Polymerasemoleküle (gebundenes Enzym) zu unterdrücken, so daß die Synthese der nicht initiierten Polymerasemoleküle (freies Enzym) an einer hinzugefügten synthetischen Matrize (poly dAT) gemessen werden konnte (Yu, 1974). Es zeigte sich, daß die vom freien Enzym katalysierte RNA Synthese an poly dAT 12 Stunden nach Teilhepatektomie um ungefähr 60% gegenüber der Kontrolle angestiegen war (Abb.2). Die Stimulierung der Synthese des gebundenen Enzyms am Chromatin lag mit einer Steigerung von 80% in derselben Größenordnung (Abb.1). Eine Erhöhung der Anzahl gebundener, initiierteter Polymerasemoleküle ist auch wahrscheinlich, da nach Hepatektomie die chromosomalen Strukturen verändert sind (Pogo et al., 1966). Das könnte zur Folge haben, daß neue Initiationsstellen für Polymerasemoleküle geschaffen werden und zusätzliche Genabschnitte aktiv sind. Andererseits kann aber auch eine Erhöhung der Initiationsfrequenz bei gleichbleibender Elongationsgeschwindigkeit zu einer größeren Anzahl initiierteter Polymerasen führen. Ein gleichzeitiges Ansteigen der RNA Synthese durch freie Polymerase läßt sich erklären, wenn man annimmt, daß sich je nach Wachstumszustand ein bestimmtes Verhältnis von gebundener

zu freier Polymerase einstellt. Eine veränderte Chromosomenstruktur könnte auch zur Folge haben, daß die Elongationsgeschwindigkeit erhöht ist. Das würde sich auch in einer Stimulierung der RNA Synthese ausdrücken.

Um die RNA Synthese den Enzymen A, B und C zuzuordnen, wurde die Synthese außerdem in Gegenwart verschiedener Konzentrationen des Inhibitors α -Amanitin gemessen. Die Polymerasen unterscheiden sich in ihrer Sensibilität gegenüber α -Amanitin. 12 Stunden nach Teilhepatektomie war die Transkription durch das gebundene A-Enzym um den Faktor 2.5 gegenüber der Kontrolle stimuliert, während die Synthese des gebundenen B- und C-Enzyms nur um den Faktor 1.5 angestiegen war. Zu dem Zeitpunkt 12 Stunden nach Hepatektomie war also die ribosomale RNA Synthese, die vom A-Enzym katalysiert wird, gegenüber der Synthese anderer RNA-Spezies durch B- und C-Enzym besonders stark stimuliert. Der Zuwachs in der Synthese an poly dAT durch freies Enzym A, B und C betrug 60-80%. Da poly dAT für alle Polymerasen eine wenig restriktive Matrize ist, stellte die Synthese der freien Polymerasen ein Maß für ihre wirklich vorhandene Konzentration dar. Da die Aktivitätssteigerung der freien Polymerasen A, B und C ähnlich war im Gegensatz zur differentiellen Steigerung der gebundenen Enzyme, muß das postulierte Verhältnis von gebundener zu freier Polymerase für die einzelnen Enzymklassen unterschiedlich sein.

Die Ergebnisse der RNA Synthese in vitro können mit den

inzwischen in der Literatur angegebenen Daten in Einklang gebracht werden. Yu (1975) berichtete, daß 17 Stunden nach partieller Hepatektomie die Synthese am endogenen Chromatin um den Faktor 2.4 zunahm, während die Synthese an poly dAT um den Faktor 1.7 stimuliert wurde. Organtini et al. (1975) fanden 18 Stunden nach Teilhepatektomie die Synthese an der endogenen Matriz e um den Faktor 2.0 und die Synthese an poly dAT um den Faktor 1.7 erhöht. Diese Ergebnisse, die eine stärkere Stimulierung des gebundenen im Verhältnis zu der des freien Enzyms berichten, stimmen mit den Resultaten dieser Arbeit überein.

Fujioka et al. (1963) hatten zeigen können, daß die RNA Synthese in vivo in den ersten fünf Stunden nach Operation stark anstieg und dann schon eine maximale Stimulierung erreicht hatte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, daß die RNA Synthese in isolierten Kernen in den ersten beiden Stunden nach Teilhepatektomie amanitinsensitiv und damit auf B-Enzym zurückzuführen war, während die amanitinresistente RNA Synthese, die man dem A-Enzym zuordnen kann, erst drei Stunden nach Operation signifikant stimuliert war.

Auch Matsui et al. (1976) berichteten, daß die nukleoplasmatische RNA Synthese durch B-Enzym schon zwei Stunden nach Teilhepatektomie anstieg, während nukleolare RNA Synthese durch A-Enzym erst vier Stunden nach Operation deutlich stimuliert war. Schmid und Sekeris (1972) stellten für die stimulierte RNA Synthese in der Leber nach

Glucocorticoidgabe auch zuerst gesteigerte hnRNA Synthese und mit Verzögerung eine Stimulierung der rRNA Synthese fest.

Da Untersuchungen in isolierten Kernen keine Abgrenzung möglicher kontrollierende Faktoren erlaubten, wurde der Schwerpunkt der Untersuchungen auf die Bestimmung der Aktivität isolierter Polymerasen gelegt. Der Einfluß von Chromatin und anderer Faktoren, die nicht fest mit den Polymerasemolekül assoziiert sind, wurden damit ausgeschaltet.

Zunächst wurde untersucht, welchen Einfluß die Regenerationszeit auf die Aktivität isolierter Polymerasen hatte. Für das isolierte B-Enzym konnte schon drei Stunden nach Teilhepatektomie eine Aktivitätszunahme beobachtet werden, während für das A-Enzym erst 5 Stunden postoperativ eine Stimulierung ausgeprägt vorhanden war. Im Vergleich zur Stimulierung der Synthese verschiedener RNA Spezies in isolierten Kernen trat die Aktivitätssteigerung der dafür verantwortlichen Polymerasen ungefähr zwei Stunden später auf. Das ist ein Hinweis, daß die Stimulierung der RNA Synthese nach Teilhepatektomie nicht direkt von der Aktivität bzw. Menge der Polymerasen abhängig ist. Es sind wahrscheinlich in stationären Leberzellen mehr Polymerasemoleküle vorhanden als für die RNA Synthese notwendig sind. Für Kerne aus Hühnereileiter konnte Cox (1976) zeigen, daß nur ungefähr 30% der gesamten B-Polymerasemoleküle aktiv in den Transkriptionsprozeß einbezogen waren.

Für die Polymeraseaktivitäten 12 Stunden nach Operation ergab sich eine differentielle Stimulierung der isolierten Enzyme A, B und C. Zu diesem Zeitpunkt war die Aktivität des A-Enzyms um den Faktor 2 angestiegen, die Enzyme B und C wurden nur um den Faktor 1.3 stimuliert. Die größere Aktivitätssteigerung des isolierten A-Enzyms im Vergleich zu der des B- und C-Enzyms kann mit den Ergebnissen der RNA Synthese in vitro in Einklang gebracht werden. Auch Yu (1975) berichtete für den Zeitpunkt 17 Stunden nach Hepatektomie eine stärkere Stimulierung des isolierten A-Enzyms um den Faktor 2.2, während die B-Enzymaktivität nur um den Faktor 1.4 erhöht war. Eine differentielle Aktivitätssteigerung der Enzyme A und B nach Chromatographie wurde auch von Organtini et al. (1975) beschrieben.

Parallel zur Aktivitätssteigerung der Kernpolymerasen zeigten die Experimente eine Reduktion von 20% in der Aktivität der cytoplasmatischen Polymerase C. Da im Kern und im Cytoplasma andere Faktoren auf die Aktivität der Polymerase C einwirken, kann die Stimulierung des C-Enzyms im Kern und die Reduktion im Cytoplasma nicht rechnerisch in Relation gebracht werden. Wie könnte man sich überhaupt einen funktionellen Zusammenhang dieser beiden Enzyme vorstellen? Es wäre möglich, daß nicht das gesamte C-Enzym von Cytoplasma, dem Ort der Synthese, in den Zellkern transportiert wird, weil die Gene, die vom C-Enzym transkribiert werden, nur 120 Nukleotide umfassen

(Forget und Weissman, 1969) und deshalb maximal zwei Polymerasemoleküle aufnehmen können. Eine erhöhte Initiationsfrequenz nach Teilhepatektomie könnte zur Folge haben, daß eine größere Anzahl von C-Polymerasemoleküle im Kern benötigt werden. Dieser Bedarf könnte aus dem "Vorrat" an Polymerase C im Cytoplasma gedeckt werden. Andererseits könnte freies Enzym C des Kerns bei der Präparation in das Cytoplasma gelangen. Wenn nach Teilhepatektomie eine größere Anzahl Polymerasen am Transkriptionsprozeß beteiligt ist, kann nur eine geringere Anzahl in das Cytoplasma gelangen.

Die Stimulierung der Aktivität isolierter Kernpolymerasen kann durch Regulation der Biosynthese oder aber auch durch Aktivierung bereits existierender inaktiver Polymerasemoleküle zustandekommen. Aktivierung kann durch Bindung eines neu synthetisierten Faktors oder auch durch strukturelle Veränderungen des Enzymmoleküls bewirkt werden. In Hinblick auf diese Frage wurden Experimente mit Cycloheximid in vivo durchgeführt. Cycloheximid verhindert Neusynthese von Enzymmolekülen, indem es die Proteinsynthese blockiert.

Zu diesem Zweck wurde der Inhibitor zum Zeitpunkt 10 Stunden nach Hepatektomie in vivo injiziert, so daß er die letzten beiden Stunden der Regenerationszeit zugegen war. Das Versuchsergebnis zeigte, daß die zum Zeitpunkt 10 Stunden nach Hepatektomie bestehende Enzymaktivität, die die Polymerasen A und C umfaßte, um 70% gegenüber der Kontrolle

stimuliert war. Diese Stimulierung betrug nach zwei weiteren Stunden in Gegenwart von Cycloheximid nur noch 30%. Die chromatographische Auftrennung des (A+C)-Bereichs in A- und C-Enzym ergab, daß bei beiden Enzymen eine restliche Stimulierung von 30% erhalten blieb.

Der größte Teil der stimulierten A-Enzymaktivität konnte nicht durch Neusynthese von Enzymmolekülen zustande gekommen sein, denn neu synthetisiertes Enzym würde aufgrund einer längeren Halbwertszeit als zwei Stunden (Benecke et al., 1973) die Proteinsynthesehemmung ohne Aktivitätseinbuße überstehen. Eine Aktivierung bereits vorhandener inaktiver Polymerasemoleküle durch ein Protein mit geringer Halbwertszeit als zwei Stunden wäre jedoch mit den Ergebnissen in Einklang zu bringen. Eine Restaktivität von 30% für das A-Enzym ließe sich erklären, wenn man für die Zunahme der Enzymaktivität nach Teilhepatektomie nicht nur Aktivierung durch einen kurzlebigen Proteinfaktor sondern auch zum Teil Enzymneusynthese annehmen würde.

Während das C-Enzym im Kern nach Cycloheximid eine Restaktivität von 30% zeigte, war zum gleichen Zeitpunkt die Reduktion des cytoplasmatischen C-Enzyms, die man 10 Stunden nach Hepatektomie beobachten konnte, nicht mehr vorhanden. Man kann sich vorstellen, daß die Zunahme der Polymerase C durch Transport des cytoplasmatischen Enzyms in den Kern zustande kommt. Wird durch Cycloheximid eine Erniedrigung der Initiationsfrequenz bewirkt, können nicht mehr am Transkriptionsprozeß beteiligten C-Polymerasemoleküle in das Cytoplasma zurücktransportiert werden. Im

Gegensatz zur Restaktivität des A-Enzyms nach Cycloheximid muß die C-Enzymaktivität, die nach Cycloheximid erhalten blieb, nicht auf Enzymneusynthese beruhen.

Die Aktivität des B-Enzyms war in Gegenwart von Cycloheximid unverändert. Sie betrug 130% der Kontrolle 10 Stunden nach Teilhepatektomie, und diese Aktivität überstand zwei Stunden Proteinsynthesehemmung ohne Aktivitätseinbuße. Die Aktivitätszunahme nach Teilhepatektomie konnte also durch Enzymneusynthese zustandegekommen sein, die 10 Stunden nach Operation schon abgeschlossen war.

Entenerythrozyten stellten das zweite System dar, das ermöglichte, veränderte RNA Synthese mit der Menge isolierter RNA Polymerasen zu vergleichen. Vogelerythrozyten zeigen in den einzelnen Differenzierungsstadien unterschiedliche RNA-Synthesemuster. Im Laufe der Entwicklung von Erythroblasten über polychromatische Erythrozyten in reife Erythrozyten hört zuerst die ribosomale RNA Synthese auf, und in reifen Erythrozyten wird nur noch hnRNA produziert, die aber nicht mehr in das Cytoplasma gelangt (Evans und Lindgrel, 1969; Attardi et al., 1970; Zentgraf et al., 1975). Untersuchungen in Erythrozyten unterschiedlichen Differenzierungsgrades sollten zeigen, welche Wirkung diese differentielle Inaktivierung des Genoms auf die Aktivität bzw. Konzentration isolierter Polymerasen hatte. Die aus normalen Enten isolierten Erythrozyten stellten fast ausschließlich reife, ausdifferenzierte Formen dar. Aus dem Blut anämischer Enten hingegen konnten neben rei-

fen Erythrozyten polychromatische Erythrozyten verschiedenen Differenzierungsgrades gewonnen werden. Mikroskopische Untersuchungen zeigten, daß im Blut anämischer Enten nur sehr selten Erythroblasten und frühe polychromatische Erythrozyten enthalten waren, die beide ribosomale RNA Synthese zeigen. Diese Beobachtung wird auch durch Angaben der Literatur gestützt, nach denen eine solche Präparation ungefähr 0.1% Erythroblasten und 1% frühe polychromatische Erythrozyten enthält (Ringertz und Bolund, 1974; Attardi et al., 1970). Man konnte also davon ausgehen, daß in polychromatischen Erythrozyten, isoliert aus dem Blut anämischer Enten, ribosomale RNA Synthese nur in sehr geringem Umfange abläuft. Die Synthese von mRNA und Hämoglobin ist noch in den späten Stadien polychromatischer Erythrozyten nachzuweisen.

Die RNA Synthese in isolierten Kernen wurde in Gegenwart von Heparin durchgeführt, so daß nur korrekt initiierte Polymerasemoleküle gemessen wurden. Heparin verhindert außerdem Initiation von nicht bereits gebundenen Enzymmolekülen. Weiterhin werden Ribonukleasen, die in diesem System in erheblichen Mengen vorkommen, durch Heparin gehemmt (Palmiter, 1973). Eine weitere Wirkung des Heparins besteht in einer Dissoziation chromosomaler Proteine von der DNA, und das kann zu einer Aktivierung von Polymerasemolekülen führen, die zwar korrekt auf dem Genom initiiert, aber in ihrer Elongation durch chromosomale Strukturen gehemmt waren.

Abb. 12 zeigt, daß die Anzahl initiiertter B-Polymerasemoleküle in polychromatischen Erythrozyten 3-4 mal höher war als in reifen Erythrozyten. Die Anzahl initiiertter B-Polymerasemoleküle nimmt also mit zunehmender Differenzierung ab. Es ist aber erstaunlich, daß in reifen Erythrozyten deutlich meßbare Mengen an Polymerase B auf dem Genom initiiert sind, obwohl keine Hämoglobinsynthese mehr stattfindet. Allerdings wird in reifen Erythrozyten hnRNA in geringem Umfange synthetisiert (Zentgraf et al., 1975). Man kann sich vorstellen, daß während der Differenzierung die chromosomalen Strukturen so verändert werden, daß die Polymerasemoleküle nur mit sehr langsamer Geschwindigkeit elongieren können. Sie könnten aber auch zum größten Teil als "ruhende" Polymerasen überhaupt nicht mehr am Transkriptionsprozeß beteiligt sein. Diese Polymerasemoleküle werden alle in Gegenwart von Heparin reaktiviert. Die Bestimmung der RNA Synthese in Gegenwart von Heparin zeigte, daß in reifen und in polychromatischen Erythrozyten keine Moleküle von A- und C-Enzym auf dem Genom initiiert waren. Die rRNA Synthese in den wenigen Erythroblasten und frühen polychromatischen Erythrozyten lag wahrscheinlich unter der Nachweisgrenze dieses in vitro-Systems. Die Aktivitätsbestimmung isolierter Polymerasen zeigte, daß in polychromatischen Erythrozyten alle drei Enzyme A, B und C in deutlichen Mengen vorhanden waren (Abb.13). Die in reifen Erythrozyten meßbare Enzymaktivität war zum größten Teil auf das B-Enzym zurückzuführen. Die

restliche Aktivität von ungefähr 10% konnte den Polymerasen A und C zugeordnet werden (Abb.13). Insgesamt waren in reifen Erythrozyten niedrigere Enzymspiegel zu beobachten. Das Vorkommen von Polymerase B in reifen Erythrozyten wird auch durch Ergebnisse von Schechter (1973) und v.d. Westhuizen et al. (1973) bestätigt. V.d. Westhuizen et al., die außerdem polychromatische Erythrozyten untersuchten, fanden dort allerdings nur B-Enzym und erklären das Fehlen von A-Enzym durch die Abwesenheit von Nukleoli. Es ist bis jetzt nicht zu erklären, warum v.d. Westhuizen et al. A- und C-Enzym in polychromatischen Erythrozyten nicht nachweisen konnten. Longacre und Rutter (1977) konnten jetzt auch zeigen, daß in polychromatischen Erythrozyten A- und C-Enzym enthalten waren. Ihre Ergebnisse zeigten, daß in frühen Entwicklungsstadien (Erythroblasten) große Mengen A- und B-Enzym vorhanden waren und daß eine Abnahme in beiden Enzymen während der Differenzierung erfolgte, die im A-Enzym stärker ausgeprägt war. Diese Daten stimmen mit den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnissen überein. Allerdings konnten Longacre und Rutter C-Enzym nur in so geringen Mengen nachweisen, daß eine quantitative Auswertung nicht möglich war.

Setzt man die Aktivität der isolierten Polymerasen A, B und C in Relation zu der in Kernen gemessenen Anzahl initiierteter Polymerasemoleküle, so wird deutlich, daß im Gegensatz zum B-Enzym keine Moleküle des A- und C-Enzyms auf dem Genom korrekt initiiert waren. Da trotz fehlender

Synthese ribosomaler RNA und niedermolekularer RNA-Spezies deutliche Mengen von A- und C-Enzym vorhanden waren, ist es unwahrscheinlich, daß die Synthese dieser RNA-Spezies über Änderungen der Polymerasekonzentration geregelt wird. Als Regulationsfaktoren sind eine Abnahme verfügbarer Initiationsstellen oder eine Verringerung der Initiationsfrequenz denkbar.

Auch auf die Regulation der mRNA Synthese scheint die Menge des B-Enzyms keinen direkten Einfluß zu haben. In reifen Erythrozyten ist trotz der Gegenwart von B-Enzym nur zu geringem Umfange hnRNA Synthese und überhaupt keine mRNA Synthese zu beobachten. Die Kontrolle scheint also einerseits auf der Stufe der Transkription stattzufinden, indem der größte Teil der initiierten Polymerasen in ihrer Elongation gehemmt werden. Andererseits muß aber auch posttranskriptionelle Kontrolle vorhanden sein, die die Translation der transkribierten hnRNA verhindert.

Das Abschalten der Gene wird also nicht in gleichem Umfange von einer Inaktivierung der entsprechenden Polymerasen begleitet.

Die Untersuchungen in regenerierender Rattenleber und in reifen Erythrozyten unterschiedlichen Differenzierungsgrades haben deutlich gezeigt, daß bei qualitativen und quantitativen Änderungen der RNA Synthese auch die Aktivitäten isolierter Polymerasen variierten. Die Aktivitätsänderung einzelner Polymerasen verlief aber nicht synchron zur Zu- oder Abnahme der Transkription entsprechender Gen-

abschnitte. Die Regulation der differentiellen Genaktivität ist also offensichtlich nicht direkt von der Konzentration der RNA Polymerasen abhängig.

Von vielen Autoren wird jedoch angenommen, daß die Polymerasekonzentrationen ein kontrollierender Faktor bei der Transkription bestimmter Genabschnitte sind. Sie stützen sich auf Ergebnisse, die eine enge Korrelation zwischen veränderter RNA Syntheserate und Schwankungen in der Menge entsprechender Polymerasen beschreiben (Yu, 1975; Organtini, 1975; Jaehning et al., 1975; Longacre und Rutter, 1977; Sebastian et al., 1973).

Bei anderen physiologischen Veränderungen (embryonale Entwicklung, Virusinfektion, Hormongabe) sind quantitative und qualitative Veränderungen in der Genaktivität bei gleichbleibenden Konzentrationen isolierter Polymerasen zu beobachten (Roeder, 1974a; Pong und Loomis, 1973; Weinman et al., 1976; Borthwick, 1975). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Regulation der Transkription von der Menge der isolierten Polymerasen unabhängig ist. Das stimmt mit der Aussage überein, die die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zulassen. Daraus muß der Schluß gezogen werden, daß an der Regulation der Transkription Faktoren (Proteine) beteiligt sind, die einen Einfluß auf die Aktivität und Selektivität der Polymerasen haben.

Zusammenfassung

Die Beziehung zwischen RNA Synthese in vivo und der Aktivität isolierter RNA Polymerasen A, B und C wurde in zwei biologischen Systemen untersucht, in denen die RNA Syntheserate experimentell verändert werden konnte.

12 Stunden nach partieller Hepatektomie konnte in den Zellen des regenerierenden Lebergewebes eine Stimulierung der RNA Synthese in vivo um 100% beobachtet werden. Versuche zur RNA Synthese in isolierten Zellkernen zeigten, daß schon eine Stunde nach Teilhepatektomie ein Anstieg zu verzeichnen war. Diese frühe Steigerung war auf eine von dem B-Enzym katalysierte RNA Synthese zurückzuführen; drei Stunden nach Operation war auch die Synthese durch A-Enzym stimuliert. Erst zwei Stunden nach der entsprechenden RNA Syntheseerhöhung konnte eine Aktivitätssteigerung isolierter RNA Polymerasen nachgewiesen werden. Die Stimulierung der RNA Synthese war also zu Beginn nicht von einer Zunahme der RNA Polymerasen abhängig. 12 Stunden nach Teilhepatektomie betrug die Stimulierung der RNA Synthese in vitro ungefähr 80%. Gleichzeitig war die Aktivität des isolierten A-Enzyms um 100%, die des B- und C-Enzyms um 30% angestiegen.

Proteinsynthesehemmung in vivo für zwei Stunden im Anschluß an 10 Stunden Regeneration hatte zur Folge, daß die stimulierte Aktivität des A- und C-Enzyms im Kern nur zum Teil erhalten blieb. Die Restaktivität dieser beiden Enzyme betrug ungefähr 30%. Die Verminderung der stimulierten C-Enzymaktivität im Kern nach Cycloheximid wurde von

einer Aktivitätszunahme der Polymerase C im Cytoplasma um 20% begleitet. Zu Beginn der Proteinsynthesehemmung war diese um 20% reduziert, so daß man annehmen kann, daß ein Austausch von Polymerase C zwischen Kern und Cytoplasma stattfindet. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Aktivität der Polymerasen A, B und C getrennt reguliert wird.

Ähnliche Schlußfolgerungen ergaben sich auch aus den Untersuchungen an Entenerythrozyten unterschiedlichen Differenzierungsgrades. In polychromatischen Erythrozyten waren die Enzyme A, B und C in deutlichen Mengen vorhanden, während in reifen Erythrozyten die Enzymaktivität zum größten Teil auf B-Enzym zurückzuführen war. Die allmähliche Inaktivierung des Genoms wurde also von einer differentiellen Abnahme der isolierten Polymerasen begleitet. Obwohl in polychromatischen Erythrozyten keine rRNA Synthese nachgewiesen werden konnte, enthielten sie signifikante Mengen A-Enzym. Ebenso waren in reifen Erythrozyten, die in vivo keine mRNA Synthese zeigen, zahlreiche B-Enzymmoleküle an die DNA gebunden. Auch in Erythrozyten werden also veränderte RNA Syntheseraten nicht allein von der Menge der Polymerasen kontrolliert.

Die Ergebnisse aus beiden Systemen zeigen deutlich, daß die Menge der RNA Polymerasen normalerweise kein begrenzender Faktor bei der Regulation der RNA Synthese sind und daß die Aktivität der einzelnen Polymerasespezies unabhängig voneinander reguliert wird.

Abkürzungen:

ATP	Adenosintriphosphat
Ci	Curie
CTP	Cytidintriphosphat
cpm	Impulse pro Minute
DEAE-	Diäthylaminoäthyl
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung
GTP	Guanosintriphosphat
mS	Milli-Siemens
poly dAT	Poly-desoxy-adenyl-desoxythymidyl- säure
POPOP	2,2'-p-Phenylenbis-(4-methyl-5-phenyloxazol)
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RNA	Ribonucleinsäure
hnRNA	heterogenous nuclear RNA
mRNA	messenger RNA
rRNA	ribosomale RNA
tRNA	transfer RNA
SS DNA	Einzelstrang-DNA
S	Sedimentationskonstante
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
UTP	Uridintriphosphat

Literaturverzeichnis

Amalric, F., M. Nicoloso, u. J.P. Zalta, 1972.

A Comparative Study of "Soluble" RNA Polymerase Activity of Zajdela Hepatoma Ascites Cells and Calf Thymus. FEBS Letters 22, 67-72.

Attardi, G., H. Parnas, und B. Attardi, 1970.

Pattern of RNA synthesis in duck erythrocytes in relationship to the stage of cell differentiation Exptl. Cell Res. 62, 11-31.

Benecke, B.J., A. Ferencz, und K.H. Seifart, 1973.

Resistance of hepatic RNA polymerases to compounds effecting RNA and protein synthesis in vivo. FEBS Letters 31, 53-58.

Borthwick, N.M., und R.M.S. Smellie, 1975.

The Effects of Oestradiol-17 β on the Ribonucleic Acid Polymerase of the Immature Rabbit Uterus. Biochem. J. 147, 91-101.

Britten, R.J., und E.H. Davidson, 1969.

Gene Regulation for Higher Cells : A Theory. Science 165, 349-357.

Burton, K., 1956.

A Study of the Conditions and Mechanism of the Diphenylamine Reaction for the Colorimetric Estimation. Biochem. J. 62, 315-323.

Chauveau, J., Y. Moulé and C. Rouiller, 1956.

Isolation of pure and unaltered liver nuclei.
Morphology and biochemical composition. *Exptl.*
Cell Res. 11, 317-321.

Cox, R.F., 1976.

Quantitation of Elongating Form A and B RNA Polymerases in Chick Oviduct Nuclei and Effects of Estradiol. *Cell* 7, 455-465.

Edmonds, M., and M.G. Caramela, 1969.

The isolation and characterisation of AMP rich poly-nucleotide synthesized by Ehrlich ascites cells. *J. Biol. Chem.* 244, 1314-1324.

Evans, M.J. and J.B. Lindgrel, 1969.

Hemoglobin Messenger Ribonucleic Acid. Synthesis of 9S and Ribosomal Ribonucleic Acid during Erythroid Cell Development. *Biochemistry* 8, 3000-3005.

Fujioka, M., M. Koga, and J. Lieberman, 1963.

Metabolism of Ribonucleic Acid after Partial Hepatectomy. *J. Biol. Chem.* 238, 3401-3405.

Forget, B.G., and S.M. Weissman, 1969.

The Nucleotide Sequence of Ribosomal 5S Ribonucleic Acid from KB Cells. *J. Biol. Chem.* 244, 3148-3165.

Garrard, W.T., and J. Bonner, 1974.

Changes in Chromatin Proteins during Liver Regeneration. *J. Biol. Chem.* 249, 5570-5579.

Getz, M.J., G.D. Birnie, B.D. Young, E. Mc Phail, and J. Paul, 1975.

A Kinetic Estimation of Base Sequence Complexity of Nuclear Poly-(A)-containing RNA in Mouse Friend Cells. *Cell* 4, 121-129.

Grisham, J.W., 1962.

A morphologic study of DNA synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver. Autoradiographie with thymidine- H^3 . *Cancer Res.* 22, 842-849.

Hahn, W.E., and C.D. Laird, 1971.

Transcription of Nonrepeated DNA in Mouse Brain. *Science* 173, 158-161.

Herman, R.C., J.G. Williams, and S. Penman, 1976.

Message and Non-message Sequences Adjacent to Poly(A) in Steady State Heterogeneous Nuclear RNA of HeLa Cells. *Cell* 7, 429-437.

Higgins, G.M., and R.M. Anderson, 1931.

Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.* 12, 186-202.

Holland, M.J., G.L. Hager, and W.J. Rutter, 1977.

Transkription of Yeast DNA by Homologous Polymerase I and II: Selective Transkription of Ribosomal Genes by RNA Polymerase I. *Biochemistry* 16, 16-24.

Hossenlopp, P., D. Wells, und P. Chambon, 1975.

Animal DNA-Dependent RNA Polymerases. Eur. J. Biochem. 58, 237-251.

Huez, G., G. Marbaix et al., 1974.

Role of the Polyadenylate Segment in the Trans-
lation of Globin Messenger RNA in Xenopus Oocytes.
Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 3143-3146.

Jacob, F., und J. Monod, 1961.

Genetic Regulatory Mechanism in the Synthesis of
Proteins. J. Mol. Biol. 3, 318-356.

Jaehning, J.A., C.C. Stewart, und R.G. Roeder, 1975.

DNA-dependent RNA Polymerase Levels during the
Response of Human Peripheral Lymphocytes to
Phytohemagglutinin. Cell 4, 51-57.

Kafatos, F.C., 1972.

mRNA Stability and Cellular Differentiation.
5th Symp. Transcription in Reproductive Tissue.
Karolinska Symposia on Research Methods in Re-
productive Endocrinology, 319-345.

Kedinger, C., M. Gniazdowski, T.L.Mandel jr., F. Gissinger,
und P. Chambon, 1970.

Amanitin: A Specific Inhibitor of one of Two DNA-
Dependent RNA-Polymerase Activities from Calf Thymus.
Biochem. Biophys. Res. Commun 38, 165-171.

- Longacre, S.S., und W.J. Rutter, 1977. Nucleotide Polymerases in Developing Avian Erythrocytes. J. Biol. Chem. 252, 273-283.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, und R.J. Randall, 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- Marushige, K. und J. Bonner, 1966.
Template properties of Liver Chromatin. J. Mol. Biol. 15, 160-174.
- Matsui, T., T. Onishi und M. Muramatsu, 1976.
Nucleolar DNA-Dependent RNA Polymerase from Rat Liver. 2. Two Forms and Their Physiological Significance. Eur. J. Biochem. 71, 361-368.
- Olins, A.L., und D.E. Olins, 1974.
Speroid Chromatin Units. Science 183, 330-332.
- Organtini, J.E., C.R. Joseph und J.L. Farber, 1975.
Increases in the Activity of the Solubilized Rat Liver Nuclear RNA Polymerases Following Partial Hepatectomy. Arch. Biochem. Biophys. 170, 485-491.
- Palmiter, R.D., 1973.
Ovalbumin Messenger Ribonucleic Acid Translation. J. Biol. Chem. 248, 2095-2106.
- Pong, S.S., und W.F. Icomis, 1973.
Multiple RNA Polymerases during Development of Dictyostelium discoideum. J. Biol. Chem. 248, 3933-3939.

Pogo, A.O., V.G. Allfrey, und A.E. Mirsky, 1966.

Evidence for increased DNA Template activity in
regenerating Liver Nuclei. *Biochemistry* 56, 550-557.

Reich, E., und I.H. Goldberg, 1964.

Actinomycin and Nucleic Acid Function. *Proc. Nucl.*
Acid Res. Mol. Biol. 3, 183-234.

Mc Reynolds, L., und S. Penman, 1974.

A Polymerase Activity forming 5S and pre-4S RNA
in isolated HeLa cell nuclei. *Cell* 1, 139-145.

Ringertz, N.R., und L. Bolund, 1974.

The nucleus during Avian Erythroid Differentiation.
In: *The Cell Nucleus* (ed. H. Busch) Vol. 3,
S. 417-446.

Roeder, R.G., 1974. Multiple Forms of DNA dependent
RNA Polymerase in *Xenopus laevis*. Isolation and
Partial Characterisation. *J. Biol. Chem.* 249,
241-248.

Roeder, R.G., 1974a. Levels of Activity During Oocyte and
Embryonic Development. *J. Biol. Chem.* 249, 249-256.

Roeder, R.G., und W.J. Rutter, 1969.

Multiple Forms of DNA-dependent RNA Polymerase in
Eucaryotic Organism. *Nature* 224, 234-237.

Rottman, F., A.J. Shatkin, und R.P. Perry, 1974.

Sequence Containing Methylated Nucleotides at the
5'Termini of Messenger RNAs: Possible Implications
for Processing. *Cell* 3, 197-199.

Schechter, N.M. 1973.

Studies of RNA Polymerase in Mature Avian Erythrocytes. Biochim. Biophys. Acta 308, 129-136.

Schmid, W., und C.E. Sekeris, 1972.

Sequential Stimulation of extranucleolar and nucleolar RNA synthesis in rat liver by cortisol. FEBS Letters 26, 109-112.

Schmid, W., und C.E. Sekeris, 1975.

Nucleolar RNA synthesis in the liver of partially hepatectomized and cortisol-treated rats. Biochim. Biophys. Acta 402, 244-252.

Sebastian, J., F. Mian, und H.O. Halvorson, 1973.

Effect of the growth rate on the level of the DNA dependent RNA polymerases in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Letters 34, 159-162.

Seifart, K.H., und C.E. Sekeris, 1969.

α -Amanitin, a specific inhibitor of transcription by mammalian RNA Polymerases. Zeit. f. Naturforschung 246, 1538-1544.

Seifart, K.H., und B.J. Benecke, 1972.

Multiple RNA Polymerase Species from Rat Liver Tissue: Possible Existence of a Cytoplasmic Enzyme. Arch. Biochem. Biophys. 151, 519-532.

Seifart, K.H., und B.J. Benecke, 1975.

DNA-dependent RNA Polymerase C. Occurrence and Localisation in Various Animal Cells. Eur. J. Biochem. 53, 293-300.

Swift, H., L. Rebhun, E. Rasch, u. J. Woodard, 1956.

In: Cellular Mechanism in Differentiation and Growth, S. 45-59.

Udvardy, A., und K.H. Seifart, 1976.

Transcription of specific genes in isolated nuclei from HeLa Cells in vitro. Eur. J. Biochem. 62, 353-363.

v.d. Westhuizen, M.C.D. Boyd, W. Fitschen, und C.v. Holt, 1973. DNA-dependent RNA Polymerase in maturing avian erythrocytes. FEBS Letters 30, 195-198.

Weinman, R., und R.G. Roeder, 1974.

Role of DNA-dependent RNA Polymerase III in Transcription of the tRNA und 5SRNA genes. Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 1790-1794.

Weinman, R., J.A. Jaehning, H.J. Raskas, und R.G. Roeder, 1976. Viral RNA synthesis and levels of DNA-dependent RNA Polymerase during replication of adenovirus. J. Virology 17, 114.

Weiss, S.B., 1960.

Enzymatic Incorporation of Ribonucleoside Triphosphates into the interpolynucleotide linkages of Ribonucleic Acid. Proc. Nat. Acad. Sci. 46, 1020-1030.

Wilhelm, J., D. Dina, und M. Crippa, 1974.

A special Form of DNA-dependent RNA Polymerase
from Oocytes of *Xenopus laevis*. Isolation and
Characterisation. *Biochemistry* 13, 1200-1208.

Williams, J.G., und S. Penman, 1975.

The Messenger RNA Sequences in Growing and
Resting Mouse Fibroblasts. *Cell* 6, 197-206.

Yu, F.-L., 1974.

Two functional states of the RNA Polymerase in
rat hepatic nuclear and nucleolar fractions.
Nature 251, 344-346.

Yu, F.-L., 1975.

Increased levels of rat hepatic nuclear free
and engaged RNA polymerase during liver regenera-
tion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64, 1107-1115.

Zentgraf, H., U. Scheer, und W.W. Franke, 1975.

Characterisation and localisation of the RNA syn-
thesized in mature avian erythrocytes. *Exptl.*
Cell Res. 96, 81-95.

Lebenslauf

- 7.6.1947 geboren in Lübeck als 1. Kind des Heinz Krüger und seiner Frau Gertud Krüger, geb. Papenfuß
- 1954-1958 Besuch der Lauerholz-Volksschule in Lübeck
- 1958-1966 Besuch der Ernestinenschule (Neusprachliches und mathematisch- naturwissenschaftliches Gymnasium) in Lübeck
- 17.10.1966 Reifeprüfung
- 1966-1968 Praktikantenzeit in der St.-Stephanus Apotheke in Lübeck
- 1.10.1968 Pharmazeutische Vorprüfung in Kiel
- 1969-1972 Studium der Pharmazie an der Albert-Ludwigs Universität in Freiburg
- 17.5.1972 Pharmazeutisches Staatsexamen
- SS 1973 Studium der Chemie an der Universität Hamburg
- 1973-1976 Studium der Humanbiologie an der Philipps-Universität in Marburg
- 1.5.1973 Beginn der vorliegenden Doktorarbeit am Institut für Physiologische Chemie der Philipps-Universität unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. K.H. Seifart

Meine akademischen Lehrer waren:

Brauer, Bresch, Cyran, Geick, Giertz, Haller,
Hefendehl, Hummel, Lauthe, Lüttringhaus, Marquardt,
Mohr, Pohl, Preuß, Schneider, Sitte, Weisz.

Aziz, Beato, Braun, Hensel, Gallwitz, Karlson,
Koransky, v. Kraft, Lorenz, Niessing, Schacht-
schnabel, Schneider, Schmid, Schwick, Seifart,
Wiegandt.

